

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin

**Vliv morfologické variability na metabolickou aktivitu a
virulenci kmenů *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis, původce bakteriálního vadnutí rajčete**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Konzultant: Ing. Blanka Kokošková, CSc.

Autor práce: Bc. Ria Navrátilová

2009

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „**Vliv morfologické variability na metabolickou aktivitu a virulenci kmenů *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, původce bakteriálního vadnutí rajčete**“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne 6. dubna 2009

.....

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Ing. Blance Kokoškové, CSc. za odborné konzultace, množství praktických rad a pečlivé vedení při zpracování této diplomové práce. Děkuji také Doc. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. za zprostředkování možnosti zpracovávat tuto diplomovou práci ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze – Ruzyni.

Autorský referát

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (dále *C. m.* subsp. *michiganensis*) je grampozitivní fytopatogenní bakterie, která způsobuje bakteriální vadnutí a rakovinu rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Tato choroba může být příčinou značných ekonomických ztrát ve všech oblastech světa, kde se rajčata pěstují, a to jak ve sklenících, tak i v polních podmínkách. Z důvodu velké škodlivosti a nesnadné ochrany proti tomuto patogenu je *C. m.* subsp. *michiganensis* řazen na seznam karanténních škodlivých organismů v České republice a jako karanténní organismus je uveden také v dalších státech Evropské unie v rámci EPPO, ve Spojených státech amerických a mnoha dalších státech světa. Základem pro úspěšnost ochrany proti bakteriálnímu vadnutí a rakovině rajčete je včasná a především správná diagnóza této choroby.

V populaci *C. m.* subsp. *michiganensis* se vyskytují různě virulentní kmeny, které s různou intenzitou infikují rostliny rajčete. Hladina virulence tohoto patogena je ovlivněna genetickými, ale i mnoha dalšími faktory. Poznání těchto faktorů by mohlo iniciovat vývoj rychlých a spolehlivých detekčních metod, které by umožnily zpřesnit diagnózu choroby a zabránit neomezenému šíření tohoto patogena.

Při kultivaci bakterie *C. m.* subsp. *michiganensis* na umělých živných médiích vytvářejí různé kmeny tohoto patogena kolonie s odlišnou morfologií. *C. m.* subsp. *michiganensis* nejčastěji tvoří lesklé mukózní neboli fluidní kolonie typické pro tento poddruh, ale objevují se i kmeny, jejichž bakteriální kolonie jsou méně fluidní, tzv. intermediální nebo suché a drsné neboli nefluidní. Cílem této práce bylo zjistit, zda morfologická variabilita různých kmenů tohoto patogena má vliv na jejich metabolickou aktivitu a virulenci.

Vybrané kmeny bakterie *C. m.* subsp. *michiganensis* byly kultivovány na ztuženém živném médiu, konkrétně na MPA neboli masopeptonovém agaru. Do testů byly používány čtyřdenní kultury jednotlivých kmenů. Pro posouzení metabolické aktivity byly morfologicky odlišné kmeny *C. m.* subsp. *michiganensis* podrobeny testování mikrobiálním identifikačním systémem Biolog Bacteria (Inc. co., USA) s využitím programu MicroLogTM2 verze 4.01B. Metoda Biolog Bacteria rozlišuje bakterie na základě toho, jak využívají různé zdroje uhlíku. V souladu s identifikačními kritérii firmy Biolog Bacteria byl z celkového počtu 31 převážně fluidních kmenů identifikován pouze 1 kmen jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tedy až na úroveň poddruhu.

Dalších 10 kmenů bylo identifikováno jako *Clavibacter michiganensis*, tedy pouze na úroveň druhu a 20 kmenů nebylo identifikováno vůbec. Při vyjádření v procentech to bylo pouze 35,5 % kmenů identifikovaných alespoň na úroveň druhu. Mikrobiální identifikační systém Biolog Bacteria byl z důvodu takto nízké procentuality identifikovaných kmenů shledán jako nedostatečně spolehlivý pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis*. Vzhledem k tomu, že tato metoda neumožnila spolehlivou identifikaci ani fluidních kmenů, nemělo smysl s jejím využitím testovat kmeny nefluidní, které až na výjimky vykazují zpravidla nižší metabolickou aktivitu než fluidní kmeny.

Pro ověření vlivu morfologické variability různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* na jejich virulenci byly provedeny testy patogenity na rostlinách rajčete náchylné odrůdy Šejk. Bakteriální suspenzí vybraných kmenů patogena byly inokulovány rostliny rajčat ve fázi 2 – 3 pravých listů. Testy byly vizuálně vyhodnocovány 2 týdny po inokulaci na základě symptomů choroby, které byly pozorovány na rostlinách. Intenzita napadení rostlin byla hodnocena pomocí čtyřbodové stupnice. Pro každý kmen byl poté vypočítán koeficient napadení a stanovena hladina jeho virulence.

Vysoký stupeň napadení vykazovaly rostliny inokulované fluidními kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, naopak kmeny nefluidní a intermediální se projeví jako méně virulentní. Z 11 testovaných kmenů 4 nejvíce virulentní kmeny byly fluidní a 4 nejméně virulentní kmeny byly nefluidní a intermediální. Mezi hladinami virulence nejvíce a nejméně virulentních kmenů byl shledán signifikantní rozdíl. Z hlediska morfologie se tedy fluidní kmeny projeví jako virulentnější než kmeny nefluidní a intermediální. Z toho bylo vyvozeno, že morfologická variabilita různých kmenů bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je jedním z faktorů podílejících se na projevu virulence tohoto patogena. Jeho celková hladina virulence je však podmíněna mnoha dalšími faktory, které mohou mít vliv na výsledky pokusů. Pro potvrzení závěru vyvozeného z výsledků této práce by bylo zapotřebí ověřit větší počet kmenů *C. m. subsp. michiganensis* s rozdílnou morofologií, a do testů patogenity by bylo vhodné zařadit například i další odrůdy rajčete či zohlednit jiné faktory ovlivňující virulenci tohoto patogena.

Porovnáním virulence českých a zahraničních kmenů bylo zjištěno, že původ kmenů neměl vliv na hladinu jejich virulence. Stejně tak nebyl prokázán významný vliv délky uchovávání kmenů patogena v bakteriologických sbírkách na stupeň jejich virulence.

Abstract

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (further *C. m.* subsp. *michiganensis*) is a Gram-positive phytopathogenic bacterium, the causal agent of bacterial wilt and canker of tomato. This disease produces considerable economic losses in commercial tomato production worldwide. As this pathogen is very harmful and the effective control measures are lacking, *C. m.* subsp. *michiganensis* is recognised as a quarantine pest in Czech republic and it's also listed as a quarantine pest in European union under EPPO, in United States of America and many other countries worldwide. The effective management of the disease caused by this pathogen is based on the early and correct diagnosis.

In the natural population of *C. m.* subsp. *michiganensis* we recognise the strains with different degree of virulence, which infect the tomato plants with different intensity. The virulence level of this pathogen is influenced by genetic and many other factors. Understanding of these factors could lead to the development of new specific and reliable diagnostic methods, which would specify the diagnosis of the disease and hamper its spread.

When cultivated on the agar medium, different strains of *C. m.* subsp. *michiganensis* generate colonies of different morphology. Most of the strains appear as fluidal (smooth, mucoid). Yet at times also intermediate (less fluidal) and nonfluidal (rough, nonmucoid) variants appear. The aim of this thesis was to ascertain, if the morphological variability of different strains of this pathogen influences their metabolic activity and virulence.

Selected strains of the bacterium *C. m.* subsp. *michiganensis* were grown on the nutrient medium, which was the yeast-peptone-glucose agar. Four days old bacterial cultures were used for all the tests. Morphologically different strains were tested by the microbial identification system Biolog Bacteria (Inc. co., USA) using the computer program MicroLogTM2 version 4.01B. The Biolog Bacteria is a proprietary carbon-source utilization test methodology. According to the identification standards of Biolog Bacteria company there was only 1 strain from the total 31 mostly fluidal strains identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* that means up to the subspecies level. Next 10 strains were identified as *Clavibacter michiganensis* that means only up to the species level, and 20 strains were not identified at all. In the percentual formulation it was only 35,5 % of strains identified at least up to the species level. Regarding such a low

percentual results of the identified strains, the microbial identification system Biolog Bacteria was found insufficiently reliable for the identification of *C. m. subsp. michiganensis*. As this diagnostic method didn't provide reliable and correct identification of the fluidal strains, it was found not appropriate to use it for testing of the nonfluidal strains which show even lower level of metabolic activity than the fluidal strains.

The pathogenicity tests on eggplant were carried out to verify the influence of the morphological variability of different *C. m. subsp. michiganensis* strains on their virulence level. The tomato plants cv. Šejk, susceptible to the bacterial canker, were used for the experiments. The 2-3 leaves phase plants were inoculated with the different strains of the pathogen. The experiments were evaluated visually 2 weeks after inoculation. The evaluation was based on the disease symptoms which appeared on tomato plants. The disease severity was evaluated using the four-grade scale. Then according to the results, the virulence level was specified for every tested strain.

The high symptoms level was observed on the plants inoculated with the fluidal strains, whereas the plants inoculated with intermediate and nonfluidal strains showed less or no symptoms of the bacterial canker. Of the total eleven strains tested the four most virulent strains were all fluidal, whereas the four least virulent strains were intermediate or nonfluidal. The significant difference was found between the virulence level of the most virulent and the least virulent strains. Regarding the bacterium morphology, the fluidal strains resulted more virulent than the intermediate and nonfluidal strains. According to this results, it was concluded that the morphological variability of the different strains of *C. m. subsp. michiganensis* is one of the factors which influence the virulence of this pathogen. However, the total virulence level of this bacterium is conditional on many other factors, which can influence the results of the experiments. For the confirmation of the results of this thesis more tests are needed, which would analyse higher number of morphologically different strains of *C. m. subsp. michiganensis*. A different tomato variety and other factors which influence the virulence of this pathogen should be included in the following experiments.

Comparing the virulence level of Czech and foreign strains of *C. m. subsp. michiganensis* it was found out that the origin of the strains didn't affect their virulence. It was also found out, that the virulence level of this bacterium is not significantly influenced by the storage length of the pathogen strains in the bacteriological collections.

Obsah

<u>1</u>	<u>ÚVOD</u>	<u>10</u>
<u>2</u>	<u>LITERÁRNÍ PŘEHLED</u>	<u>12</u>
2.1	VÝNAM CHOROBY A GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ	12
2.2	CHARAKTERISTIKA A TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ PATOGENA <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	13
2.3	MORFOLOGIE A PRINCIP PATOGENITY A VIRULENCE BAKTERIE <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	14
2.4	HOSTITELSKÝ OKRUH BAKTERIE <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	17
2.5	PŘÍZNAKY BAKTERIÁLNÍHO VADNUTÍ A RAKOVINY RAJČETE	18
2.6	EKOLOGIE A EPIDEMIOLOGIE PATOGENA <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	20
2.7	DETEKCE A DETERMINACE PATOGENA <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	23
2.7.1	IZOLACE	23
2.7.2	DETEKCE A IDENTIFIKACE.....	24
2.7.2.1	Mikroskopické metody	24
2.7.2.2	Kultivační metody	24
2.7.2.3	Chemické metody	25
2.7.2.4	Biochemické metody	26
2.7.2.5	Sérologické metody	26
2.7.2.6	Molekulárněbiologické metody	27
2.7.2.7	Biologické testy	28
2.7.3	SHRNUTÍ.....	29
2.8	OCHRANA RAJČAT PROTI INFEKCI PATOGENEM <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i>	31
2.8.1	PĚSTITELSKÁ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ.....	32
2.8.2	CHEMICKÁ OCHRANA	33
2.8.3	ALTERNATIVNÍ ZPŮSOBY OCHRANY	35
2.8.4	FYTOSANITÁRNÍ OPATŘENÍ.....	36
<u>3</u>	<u>CÍL PRÁCE</u>	<u>37</u>
<u>4</u>	<u>MATERIÁL A METODY</u>	<u>38</u>
4.1	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY.....	38

4.2	KULTIVACE PATOGENA NA UMĚLÝCH ŽIVNÝCH MÉDIÍCH	38
4.3	TESTOVÁNÍ METABOLICKÉ AKTIVITY PATOGENA METODOU BIOLOG BACTERIA	39
4.4	BIOLOGICKÉ TESTY	40
<u>5</u>	<u>VÝSLEDKY</u>	<u>42</u>
5.1	MAKROSKOPICKÉ HODNOCENÍ BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ <i>C. M. SUBSP.</i> <i>MICHIGANENSIS</i>	42
5.2	VYHODNOCENÍ IDENTIFIKACE RŮZNÝCH KMENŮ <i>C. M. SUBSP. MICHIGANENSIS</i> POMOCÍ MIKROBIÁLNÍHO IDENTIFIKAČNÍHO SYSTÉMU BIOLOG BACTERIA.....	43
5.3	VYHODNOCENÍ TESTŮ PATOGENITY VYBRANÝCH KMENŮ <i>C. M. SUBSP.</i> <i>MICHIGANENSIS</i> NA ROSTLINÁCH RAJČETE	45
5.4	STATISTICKÉ HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ZÍSKANÝCH V TESTECH PATOGENITY	48
<u>6</u>	<u>DISKUSE.....</u>	<u>51</u>
<u>7</u>	<u>ZÁVĚR.....</u>	<u>57</u>
<u>8</u>	<u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u>	<u>59</u>
<u>9</u>	<u>PŘÍLOHY</u>	<u>65</u>
9.1	TABULKY	65
9.2	OBRÁZKY	71

1 Úvod

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (dále *C. m.* subsp. *michiganensis*) je grampozitivní fytopatogenní bakterie, která způsobuje bakteriální vadnutí a rakovinu rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Tento patogen byl poprvé popsán v Severní Americe (Smith, 1910), kde byla poprvé zaznamenána jím způsobená choroba na porostech rajčat. Bakteriální vadnutí je jednou z nejzávažnějších chorob u skleníkových rajčat. Způsobuje značné ekonomické ztráty ve všech oblastech světa, kde se rajčata pěstují, a to jak ve sklenících, tak i v polních podmínkách. V některých oblastech dosahovaly ztráty na výnosu při napadení rajčat touto chorobou až 80 %.

Patogen je specializován na kolonizaci cévních svazků rajčete, ze kterých později proniká i do okolních parenchymatických pletiv a skrze praskliny na stonku se dostává až na povrch rostliny a sekundárně se šíří. Prvotním příznakem onemocnění je unilaterální vadnutí jednotlivých lístků zpeřených listů, které je zpočátku reverzibilní, později ireverzibilní. Následně dochází k vadnutí, usychání a hnědnutí celých listů, stonků a nakonec celé rostliny. Při napadení starších rostlin způsobuje nekrózy listů a skvrnitost plodů.

Za hlavní zdroj nákazy je považováno infikované osivo a sazenice. Patogen také přežívá dlouhou dobu v infikovaných rostlinných zbytcích v půdě a šíří se i kontaminovaným nářadím a nádobami. Chemickou ochranu proti bakteriálnímu vadnutí rajčete lze provádět aplikací přípravků na bázi měďnatých sloučenin, avšak jejich účinnost je jen částečná a jejich používání bylo omezeno kvůli jejich negativnímu vlivu na životní prostředí. Rezistentní odrůda rajčete není v současnosti na trhu dostupná a tak ochrana proti této chorobě je založena především na používání zdravého certifikovaného osiva a dodržování preventivních ochranných opatření. Z důvodu velké škodlivosti a nesnadné ochrany proti tomuto patogenu je *C. m.* subsp. *michiganensis* řazen na seznam karanténních škodlivých organismů v České republice a jako karanténní organismus je uveden také v dalších státech Evropské unie v rámci EPPO, ve Spojených státech amerických a mnoha dalších státech světa.

Identifikace a detekce *C. m.* subsp. *michiganensis* se provádí různými způsoby. Rychlými a senzitivními metodami jsou ELISA, IFA a PCR, které kromě testování čistých kultur, jsou schopny detekovat patogena i v rostlinných pletivech bez jeho izolace, avšak tyto metody neumožňují izolaci patogena, nepodávají žádné informace

o životnosti bakteriálních buněk a někdy mohou poskytovat falešné výsledky. Izolace a kultivace patogena na umělém živném médiu a následná identifikace podezřelých izolátů pomocí testů patogenity či jiných testů je velmi pracná, časově náročná a může být komplikována v důsledku přerůstání patogena jinými mikroorganismy. Výzkum se soustřeďuje na vývoj rychlých, citlivých a specifických technik pro detekci *C. m.* subsp. *michiganensis*, a to především zkoumáním jeho genetického profilu.

V populaci *C. m.* subsp. *michiganensis* existují různě virulentní kmeny, které s různou intenzitou infikují hostitele. Bylo objeveno, že bakteriální buňky tohoto patogena obsahují dva plazmidy, které jsou nositeli genů virulence a pro metodu PCR byly vyrobeny primery založené na bázi plazmidových markerů. V buňkách patogena však často dochází ke ztrátě plazmidů a proto tato metoda neposkytuje vždy správné výsledky. Výsledky genomových analýz *C. m.* subsp. *michiganensis* jsou dále zkoumány s cílem objevení dalších genů spojených s virulencí této bakterie pro možnost vývoje nových detekčních metod. Předmětem výzkumu jsou i vlivy dalších faktorů na virulenci tohoto patogena. Mezi ně patří například produkce exopolysacharidů bakteriální buňkou a vliv podmínek vnějšího prostředí. Virulence jednotlivých bakteriálních kmenů *C. m.* subsp. *michiganensis* by mohla být spojena i s jejich morfologickými a biochemickými vlastnostmi. Tyto souvislosti jsou zkoumány v této diplomové práci.

2 Literární přehled

2.1 Výnam choroby a geografické rozšíření

Bakteriální vadnutí rajčete způsobené bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910; Davis *et al.*, 1984) je považováno za nejvýznamnější bakteriální chorobu rajčat způsobující značné ekonomické ztráty na celém světě (Garteman *et al.*, 2003). Patogen byl poprvé popsán v Severní Americe a pravděpodobně i jeho původ spadá do této oblasti světa (EPPO A2 List of pests, 2008).

Bakteriální vadnutí rajčete způsobené *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (dále *C. m.* subsp. *michiganensis*) byla poprvé zjištěna v roce 1909 ve státě Michigan (USA) ve skleníkové kultuře rajčat, a byla pojmenována „Grand Rapid disease“ podle jména lokality jejího objevení. Několik let poté, v roce 1914 byla choroba pozorována v centrální Itálii v oblasti Chieti a popsána jako bakteriální vadnutí, později po jejím dalším rozšíření byla pojmenována jako „bacterial canker“ (Belli *et al.*, 2007).

Nyní je tato choroba známa pod názvy Bacterial canker, bird's eye (anglicky), Chancre bactérien (francouzsky), Bakterienwelke (německy), Marchitez bacteriana (španělsky) a Cancro batterico (italsky) a v České Republice je označována jako bakteriální vadnutí a rakovina rajčete (EPPO A2 List of pests, 2008).

V současnosti se toto vážné onemocnění vyskytuje po celém světě, ve všech oblastech kde se pěstují rajčata (Hazzard *et al.*, 2006).

V Severní Americe se nejvýznamnější epidemie bakteriálního vadnutí rajčete způsobující ztráty na výnosu až 80 % odehrály v 30. a 80. letech 20. století ve středozápadě Spojených států a v 60. a 80. letech v Ontariu a Severní Karolíně (Gleason *et al.*, 1993). V roce 1942 byl patogen *C. m.* subsp. *michiganensis* zavlečen z USA infikovaným i do Velké Británie (Prokinová, 2001). Poslední výskyt bakteriálního vadnutí rajčete ve Velké Británii v současné době byl hlášen v roce 2008 poté, co se tam toto onemocnění již deset let nevyskytovalo (Vondrášková, 2008). Navzdory všem ochranným opatřením jsou v současné době hlášeny výskyty bakteriálního vadnutí rajčete v mnoha státech Evropy (León *et al.*, 2006).

V Izraeli je bakteriální vadnutí rajčete známo od roku 1963 a od té doby se vyskytovalo sporadicky. K vážné epidemii došlo v roce 2000 v jižní části země, která je hlavní pěstitelskou oblastí skleníkových rajčat a choroba se od té doby rozšířila po celé zemi, i mezi polní rajčata (Kleitman *et al.*, 2008).

V Turecku se vyskytlo toto onemocnění v roce 2001, a to v šesti různých produkčních podnicích ve východní Anatolii. Rozsah napadení byl téměř stoprocentní a způsobil velké ekonomické ztráty (Sahin et al., 2002).

V České republice bylo v posledních letech bakteriální vadnutí rajčete zjištěno ve foliovnicích v Otaslavicích v okrese Prostějov v roce 2007 (Růžička, 2007) a bylo i laboratorně potvrzeno u rajčat u soukromého pěstitele v Lipňanech v okrese Přerov v roce 2008 (Růžička, 2008).

Výskyt bakteriálního vadnutí rajčete je vzhledem k prováděným karanténním opatřením relativně vzácný, avšak objeví-li se tato choroba v porostu, její důsledky bývají velmi ničivé a obtížně se eradikuje z místa výskytu. Ztráty na výnosech se pohybují mezi 10 – 30 %, výjimečně dosahují i 70 %. K tomuto onemocnění mají sklon všechny typy rajčat, postiženy bývají polní, ale zejména skleníkové porosty, což je způsobeno zejména vhodnými podmínkami prostředí pro množení a šíření patogena (Gleason et al., 1993).

Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je na seznamu karanténních patogenů Evropské a středozevní organizace pro ochranu rostlin (EPPO) (Hazzard et al., 2006) a je uznávána jako karanténní organismus ve státech Evropské unie (European Union, 1995) a ve Spojených státech amerických (Kaneshiro et al., 2006).

2.2 Charakteristika a taxonomické zařazení patogena *C. m. subsp. michiganensis*

Erwin F. Smith (1910) poprvé pojmenoval patogena, původce bakteriálního vadnutí rajčete, jako *Bacterium rnichiganense*, poté jako *Aplanobacter michiganense*. Po dalších pokusech o přejmenování, zahrnujících názvy jako *Pseudomonas michiganensis*, *Phytomonas michiganensis*, *Erwinia michiganensis*, and *Mycobacterium rnichiganense* se nakonec ustálil název *Corynebacterium michiganense*, který byl uznávaný téměř 50 let. V 80. letech byl patogen reklasifikován na základě nových poznatků o složení jeho buněčné stěny a zařazen do rodu *Clavibacter* a jeho oficiální název platný dodnes je *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (Gleason et al., 1993).

Jedná se o grampozitivní bakterii s tlustší peptidoglykanovou buněčnou stěnou bez vnější lipoproteinové membrány, patřící do oddělení *Firmicutes*, třídy *Thallobacteria*, čeledi *Micrococcaceae* a rodu *Clavibacter*. V tomto rodu jsou zastoupeni typičtí původci vaskulárních okluzí patřící k jedinému druhu *Clavibacter michiganensis*, všichni

specializovaní na kolonizaci cév neboli trachejí rostlin. Pro bakteriální choroby vzniklé kolonizací cév se někdy používá označení tracheobakteriózy (Kúdela et al., 2002).

Druh *Clavibacter michiganensis* je rozdělen do pěti poddruhů podle jejich typických hostitelů. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* napadá brambor, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* způsobuje vadnutí kukuřice, *C. michiganensis* subsp. *tesselarius* je původce mozaiky listů pšenice, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* způsobuje vadnutí vojtěšky a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, jak již bylo uvedeno je obligátním patogenem rajčat (Gartemann et al., 2003).

2.3 Morfologie a princip patogenity a virulence bakterie *C. m. subsp. michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. je aerobní, grampozitivní bakterie řadící se do oddělení *Firmicutes*. Její buňky jsou tyčinkovité koryneformní, což znamená, že vykazují náznaky větvení. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,6-0,7 x 1,5-2,5 μm . Optimální teplota pro jejich růst je 24-27°C, při teplotách přesahujících 35°C se nevyvíjí (Belli et al., 2007). Při kultivaci na umělém pevném médiu vytváří většina kmenů typické bakteriální kolonie žlutavého zbarvení, více či méně fluidní, vyklenuté a s hladkým okrajem (Kaneshiro et al., 2006).

Jako většina fytopatogenních bakterií, *C. m. subsp. michiganensis* produkuje vysokomolekulární exopolysacharidy (EPS), které mají pro její vývoj významnou funkci. Kolem bakteriální buňky vytváří vodou nasycený obal a slouží tak jako její ochrana proti dehydrataci. EPS z důvodu jejich kyselé povahy zastávají roli iontoměničů, které přivádějí minerální látky a živiny k bakterii a chrání ji zachycováním toxických látek. EPS dále zabraňují rozpoznání bakteriální buňky rostlinou po průniku do jejích pletiv a rovněž blokují aglutininy a rozkládají fytoalexiny a reaktivní formy kyslíku, čímž chrání bakterii proti reakcím obranného systému rostliny. Pomocí EPS bakterie snadno přilne k abiotickým i biotickým povrchům a tím je jí umožněna kolonizace rostlinných pletiv. Produkce EPS je tak předpokladem pro úspěšnou infekci rostliny rajčete a rozvoj choroby. (Jahr et al., 1999).

EPS společně s velkým množstvím bakteriálních buněk, které dosahuje až 10^9 na 1 gram rostlinného pletiva, ucpávají cévy rostliny rajčete a mohou tím způsobit omezení příjmu vody a následné vadnutí. Bylo prokázáno, že EPS působí i jako fytotoxin. EPS extrahované z buněk *C. m. subsp. michiganensis* způsobovaly vadnutí řízků epikotylu

rajčete a rozkládaly thylakoidní membránu izolovaných chloroplastů. Laboratorně připravené kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, které produkovaly jen 10 % EPS oproti běžným kmenům tohoto patogena však byly stále schopny kolonizovat pletiva rajčete a vyvolávaly u nich vadnutí. Z toho bylo vyvozeno, že produkce EPS není hlavním faktorem patogenity bakterií *C. m. subsp. michiganensis* (Gartemann et al., 2003).

Bermppohl et al. (1996) ve své studii prokázali, že různé složení EPS je spojeno se schopností kolonizovat rostlinná pletiva a hraje roli při rozpoznání bakterií rostlinou v raných stádiích infekce.

Kromě EPS produkuje *C. m. subsp. michiganensis* velké množství extracelulárních enzymů jako celulázy a pektinázy, které rozkládají buněčnou stěnu hostitelských buněk, narušují cévní a okolní parenchymatická pletiva a podílejí se tak na rozvoji choroby (Jahr et al., 1999).

Pro objasnění příčiny vzniku choroby na molekulární úrovni bylo nutné identifikovat geny *C. m. subsp. michiganensis* zodpovědné za patogenitu a zjistit význam jejich genových produktů. Většina kmenů tohoto patogena obsahuje ve svých buňkách dva plazmidy označené jako pCM1 a pCM2. Bylo zjištěno, že změna kultivační teploty z 26 na 32°C způsobila ztrátu obou těchto plazmidů, a tak byl izolován bezplazmidový kmen označený jako CMM100. Tento kmen v testech patogenity na rostlinách nevyvolával chorobu, přestože u něj byla zachována schopnost kolonizovat rostlinná pletiva a produkovat EPS. Další dva uměle vytvořené kmeny patogena, obsahující buď pouze jeden nebo pouze druhý plazmid vyvolávaly chorobu rajčete, ale byla u nich pozorována snížená virulence a vadnutí se projevilo až po delší době a v menší míře. Vysoká virulence byla zachována pouze u kmenů obsahujících oba plazmidy. Bylo tak prokázáno, že oba plazmidy jsou nositeli genů ovlivňujících patogenitu *C. m. subsp. michiganensis* (Meletzus et al., 1993).

Bylo zjištěno, že plazmid pCM1 je nositelem genu *celA*, který kóduje endo- β -1,4-glukanázu. Introdukcí genu *celA* do buněk uměle získaného avirulentního kmene, který neobsahoval tento gen, došlo k obnovení aktivity celulázy a současně k obnovení virulence bakteriálních buněk. Z toho bylo vyvozeno, že celuláza kódovaná genem *celA* v plazmidu pCM1 je jedním z faktorů patogenity a je zodpovědná za projevy choroby bakteriálního vadnutí rajčete (Jahr et al., 2000).

Klonováním restričního fragmentu plazmidu pCM2 do buněk bezplazmidového avirulentního kmene CMM100 byl objeven další faktor patogenity, gen označený jako *pat-1* kódující serin proteázu (Dreier et al., 1997). Zatím není jasné, jakou roli tento gen

přesně hraje ve vzathu patogena s rostlinou. Jím kódovaná proteáza zajišťuje pravděpodobně nutriční funkci poskytováním aminokyselin rozkladem proteinů. Jejím působením by také mohly být uvolňovány některé peptidy vyvolávající smrt rostlinných buněk a mohla by být faktorem virulence, jelikož pravděpodobně ovlivňuje obranný systém rostliny (Hogenhout, Loria, 2008).

Na základě objevení genu *pat-1* vyvinuli Dreier et al. (1997) specifické primery pro PCR detekci patogena v rostlinných pletivech. Tato metoda je sice vysoce citlivá, avšak je schopná odhalit pouze virulentní kmeny *C. m. subsp. michiganensis* a vzhledem k možné ztrátě plazmidů, které nesou gen *pat-1* poskytuje často falešně negativní výsledky (Kaneshiro, Alvarez, 2001).

Burger et al. (2005) objevili tři homologní geny ke genu *pat-1*. Dva z nich se nacházejí v plazmidu pCM2 a jeden v chromozomu bakteriální buňky *C. m. subsp. michiganensis*. Avšak klonování těchto genů do buněk avirulentního kmene CMM100 nezpůsobilo obnovení jejich virulence.

Dalším prokázaným faktorem patogenity bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je gen *tomA* kódující enzym tomatinázu. Ta rozkládá alkaloid α -tomatin, který je produkován rostlinou rajčete jako jedna z důležitých složek obranného mechanismu proti patogenům. Tímto bakterie blokuje obrannou reakci rostliny rajčete (Hogenhout, Loria, 2008).

Jak již bylo zmíněno výše, plazmid pCM2 je poměrně nestabilní a manipulací bakteriálních buněk v laboratorních podmínkách dochází často k jeho ztrátě. Gartemann et al. (2003) zkoumali izoláty kmenů přírodní populace *C. m. subsp. michiganensis* z různých oblastí a zjistili, že 80% z nich tento plazmid obsahovalo. Toto zjištění poukazuje, že plazmidy tohoto patogena by mohly obsahovat transferový gen, který by bakterii umožnil znovu získat plazmidy od vhodného dárce, poté co došlo k jejich ztrátě.

V dalších pokusech bylo prokázáno, že v 75 % případů bakterie přijala plazmid pCM1 a dokonce v 97 % případů dokázala přijmout plazmid pCM2 od vhodných donorů. Přestože se úspěšnost transferu plazmidů lišila mezi jednotlivými kmeny získanými z různých oblastí, z těchto pokusů bylo vyvozeno, že oba bakteriální plazmidy mají schopnost přesunu *in planta* a tudíž jsou nositeli transferových genů a mají mobilizační schopnosti (Burger, Eichenlaub, 2003).

Fluktuace plazmidů nesoucích geny patogenity v populaci *C. m. subsp. michiganensis* tak možná poskytuje možnost regulovat a přizpůsobovat virulenci patogena za účelem udržení životaschopnosti hostitele a vytvoření rovnováhy ve vztahu patogena a hostitelské rostliny (Gartemann et al., 2003).

Výměna genů mezi jednotlivými populacemi patogena může být vyvolána různými podmínkami vnějšího prostředí. Změny v genomu patogena zapříčiňující změny ve virulenci jsou způsobeny vystavením stresovým podmínkám. Těmi mohou být například nízké teploty a nedostatek živin v podmínkách vně hostitelských pletiv, nebo působení obranných látek uvnitř pletiv hostitelské rostliny. Všechny tyto podmínky, ve kterých je patogen nucen upravit svůj metabolismus upřednostňující vlastní přežití před rozmnožováním, mohou aktivovat změny v genomu patogena vedoucí ke zvýšení virulence (Arnold et al., 2007).

Výsledky genomových analýz bakterie *C. m. subsp. michiganensis* jsou dále zkoumány s cílem objevení dalších genů spojených s patogenitou této bakterie. Další výzkum je zapotřebí pro úplné objasnění molekulární podstaty této choroby a pro možnost vývoje nových metod pro detekci tohoto patogena (Gartemann et al., 2003).

2.4 Hostitelský okruh bakterie *C. m. subsp. michiganensis*

Hlavními ekonomicky významnými hostiteli tohoto patogena jsou rajčata (*Lycopersicon esculentum*), ale patogenem byly též infikovány ostatní *Lycopersicon* spp. a planě rostoucí rostliny *Solanum douglasii*, *S. nigrum* and *S. triflorum*. Mnoho rostlin čeledi *Solanaceae* je vnímavých k umělé infekci (Thyr et al., 1973). Stamova & Sotirova (1987) označily též pšenici, ječmen, žito, oves, slunečnici, vodní meloun a okurku jako hostitele vnímavé k umělé infekci *C. m. subsp. michiganensis*.

V regionech Evropské a středozevní organizace pro ochranu rostlin (EPPO) je hlavním hostitelem rajče, zatímco některé náchylné druhy plevelů čeledi *Solanaceae* mohou sloužit jako potenciální rezervoár tohoto patogena (EPPO A2 List of pests, 2008).

Kůdela (2002) jako hostitelské rostliny uvádí rajče a planě rostoucí rostliny z rodu *Solanum*, např. lilek černý (*Solanum nigrum*).

Belli et.al. (2007) uvádějí, že choroba způsobená *C. m. subsp. michiganensis* postihuje jak skleníková, tak polní rajčata. Kromě toho patogen napadá i další rostliny čeledi *Solanaceae*, například *Solanum mammosum*, *S. douglasii*, *S. nigrum* a *Nicotiana glutinosa*, které nemají hospodářský význam, avšak slouží jako rezervoár tohoto patogena.

2.5 Příznaky bakteriálního vadnutí a rakoviny rajčete

Symptomy napadení rajčete bakterií *C. m. subsp. michiganensis* se objevují na všech rostlinných orgánech a jsou velmi rozmanité (Calzolari, 1986). Můžeme je rozdělit do dvou skupin na základě toho, zda jsou způsobeny systémovou či lokální infekcí.

Je-li primárním zdrojem infekce osivo, či dojde-li k poranění rostliny a průniku patogena přímo do vaskulárního systému, objevují se nejprve symptomy systémové infekce, především vadnutí. Naopak symptomy lokální infekce, kterými jsou především okrajové nekrózy listů a listová skvrnitost (**viz. Přílohy Obr. 5**), se objevují brzy poté, kdy dojde k infekci rostliny epifytickým šířením patogena skrze ulomené trichomy, mikroporanění způsobená hmyzem nebo přirozenými otvory, například hydathodami. Někdy se však lokální infekce může vyvinout i v systémovou infekci a pozorujeme pak celou škálu symptomů (Gleason et al., 1993).

Prvním nápadným příznakem onemocnění je vadnutí jednotlivých lístků na jedné straně lichozpeřených listů (tzv. unilaterální vadnutí), které se miskovitě zkrucují, usychají a hnědnou (**viz. Přílohy Obr. 1**). Následuje vadnutí a usychání celých listů (nezřídka jen na jedné straně stonku), jednotlivých stonků a nakonec celé rostliny (Cariddi, 1997)

Projevy prvních příznaků choroby se mohou poněkud lišit u rostlin pěstovaných v polních a skleníkových podmínkách. V polních porostech bývá prvním příznakem usychání špiček lístků na spodních listech, které postupně postihne i výše postavené listy (**viz. Přílohy Obr. 2**). Celá rostlina pozvolna usychá, aniž by se objevily příznaky vadnutí. Ve skleníkových porostech bývá prvním příznakem reverzibilní vadnutí objevující se v horkých dnech. Na listech lze pozorovat bílé, později hnědé mezižilkové léze. Vadnutí se brzy stává ireverzibilním a celá rostlina nakonec usychá (Kúdela et al., 2002)

Na řezu řapíkem a stonkem je patrná diskolorace neboli zežloutnutí až zhnědnutí cévních svazků a okolního parenchymatického pletiva (**viz. Přílohy Obr. 9**). Po odlomení řapíku můžeme v místě srůstu se stonkem pozorovat zhnědlé cévní svazky ve tvaru podkovy. Při stisknutí napadených řapíků či stonků vytéká ze ztmavých pletiv žlutohnědý bakteriální sliz (Cariddi, 1997). Někdy jsou v místě cévních svazků a průvodního pletiva dutiny, které zasahují až k povrchu stonku. Ve spodní části stonku a v kořenech nebývá diskolorace cévních svazků patrná.

V pokročilém stadiu choroby jsou někdy na hlavních žilkách listů, řapících a stoncích světle zbarvené podélné pruhy, později praskliny (**viz. Přílohy Obr. 1**), jimiž vytéká za vlhkého a teplého počasí na povrch rostliny bakteriální sliz (exsudát). Přes

stopku proniká patogen cévními svazky do semen a dužniny plodu. Uvnitř těchto plodů se někdy vytvoří malé hnědé dutiny (Calzolari, 1986).

Dostanou-li se bakterie z vodivých pletiv přes podélné praskliny na povrch rostliny, což však nebývá příliš často, mohou sekundárně infikovat listy, stonky a plody a vyvolat u nich skvrnitost. Na povrchu plodů se objevují zpočátku vodnaté bělavé, později hnědé, slabě vyvýšené skvrny s drsným povrchem, obklopené světlým dvůrkem, nazývané skvrny typu „ptačí oko“, které nezhřídka plošně splývají (**viz. Přílohy Obr. 4, 6**) (Belli et al., 2007; Gleason et al., 1993). Tyto skvrny jsou velké kolem 3-6 mm v průměru. Na rostlinách jsou tyto příznaky vzácné, ale pokud se objeví, jsou důležitým vodítkem při diagnóze (Hazzard et al., 2006).

Listová skvrnitost se vyskytuje za vlhkého počasí. Zpočátku se objevují puchýřovité skvrny, které s postupujícím stářím hnědnou a splývají. Infikovaná semena jsou nezhřídka deformovaná a černá. Z infikovaných semen vyrostou jen poměrně malé procento rostlin, které mohou předčasně odumřít nebo vykazují symptomy systémové infekce. Pokud systémově infikované rostliny neodumřou a zakvetou, květy a plody opadávají. Pokud neopadnou, jsou buď bez nápadných symptomů, nebo jsou bělavě zbarveny, případně vykazují bělavou síťovitou kresbu (Kúdela et al., 2002).

Při identifikaci patogenu jen na základě symptomů by mohlo dojít k záměnám s jinými patogeny. Například systémové vadnutí může způsobovat i *Verticillium albo-atrum* nebo *Fusarium oxysporum*, ale v těchto případech dřev není odlišně zbarvená a zčernání cévních svazků v lodyze není tak nápadné. Místo pravého vadnutí se může vyskytnout žloutnutí mezi žilnatinou. V teplých, tropických a subtropických oblastech způsobuje vadnutí bakterie *Ralstonia solanacearum*. V tomto případě jsou cévní pletiva také zčernalá, ale při příčném rozříznutí stonku vytékají z cévních svazků kapénky běložluté viskózní tekutiny. Pokud je část stonku ponořena do vody, vyteče z xylému mléčný proud (Hazzard et al., 2006) Dalším příkladem je bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, která způsobuje skvrnitost papriky a rajčat. K její záměně s *C. m. subsp. michiganensis* na základě symptomů by mohlo dojít v rané fázi napadení zelených plodů rajčat, kde obě bakterie způsobují bledě zelené vodnaté okrouhlé skvrny. V pozdější fázi vývoje choroby a na zralých plodech však již lze průkazně odlišit skvrny způsobené jednotlivými patogeny. U bakteriální skvrnitosti jsou skvrny tmavé, vpadlé a na jejich okrajích je odlupující se epidermis, kdežto u bakteriálního vadnutí rajčete pozorujeme typické skvrny s tmavým středem, mírně vystouplé a obklopené bělavým kruhem (Gleason et al., 1993; Kúdela et al., 2002).

Komplex symptomů objevujících se na rostlinách v různé době a na různých místech je velmi proměnlivý a je ovlivňován především stářím rostlin, způsobem infekce, náchylností odrůdy a vnějšími podmínkami prostředí. Z toho vyplývá, že identifikace původce onemocnění jen na základě symptomů nemusí být vždy přesná (Gleason et al., 1993).

Poměrně sporným aspektem projevu choroby je její inkubační doba, která bývá velmi variabilní. Od infekce do doby kdy se projeví první příznaky u systémového onemocnění je dle různých studií uváděno 7 až 84 dní. K faktorům, které prodlužují délku inkubační doby, patří nižší teplota, vyšší stáří rostlin, nižší náchylnost jednotlivých odrůd k patogenu a nižší koncentrace inokula (Chang et al., 1992). Dle Kúdely (2002) je inkubační doba 2-3 týdny a více a další rozvoj choroby je pozvolný. Od doby kdy se objeví první zjevné příznaky, až do odumření celé rostliny, může uplynout 8 týdnů i více.

2.6 Ekologie a epidemiologie patogena *C. m. subsp. michiganensis*

Primárním zdrojem inokula a jedním z hlavních zdrojů šíření nákazy jsou semena rajčete. Především jimi se patogen šíří i na velké vzdálenosti a způsobuje výskyt choroby v oblastech pěstování rajčat po celém světě (Garteman et al., 2003). Choroba je tedy obzvláště významná pro producenty semen rajčat, jelikož právě tato jsou považována za zdroj primárního inokula (León et al., 2006).

Semena, ve kterých bakterie přežívají i po velmi dlouhá období (minimálně 8 měsíců), mohou být infikována vnitřně krátce po opylení, nebo během zrání plodů. Bakterie skrze vaskulární systém rostliny pronikne až dovnitř semene a infikuje tak endosperm a embryo. Rovněž povrch semene může být kontaminován bakteriemi pocházejícími z lézí na povrchu plodů a z dřene plodů (parenchymu perikarpu). Bakterie tedy bývají lokalizovány jak uvnitř, tak na povrchu semene a mají schopnost infikovat mladou rostlinu zevnitř a kolonizovat rostlinné tkáně během jejího růstu. Semena mají tedy velmi důležitou epidemiologickou roli (Calzolari, 1986).

Sazenice vyrostlé z infikovaných semen mohou rychle uvadnout a odumřít. Zůstanou-li na povrchu pole, stávají se pak zdrojem nákazy pro další rostliny vyrostlé ze zdravých semen. Z infikovaných semen se však mohou vyvinout i rostlinky zdánlivě zdravé, u kterých se až v pokročilejší fázi jejich vývoje objeví vadnutí a usychání lístků a listů, což jsou první typické příznaky onemocnění způsobené kolonizací cévního systému (Belli et al., 2007). V tomto případě hovoříme o latentně infikovaných sazenicích, které

jsou kromě semen dalším významným zdrojem šíření choroby i na velké vzdálenosti (Kúdela et al., 2002).

C. m. subsp. michiganensis přezimuje a přežívá na infikovaných rostlinných zbytcích a to poměrně dlouhou dobu. Jedná se především o infikované stonky, spíše než listy (Calzolari, 1986). Gleason (1991) uvádí, že ve státě Iowa v USA způsobily infikované posklizňové zbytky epidemii bakteriálního vadnutí rajčete v následné kultuře rajčat, u kterých tak došlo ke snížení výnosu o 27 %. To byl první přímý důkaz, že nakažené posklizňové zbytky mohou způsobit rozvoj choroby a ekonomické ztráty u následné kultury rajčat.

Doba přežívání patogena v posklizňových zbytcích se liší podle podmínek prostředí v dané lokalitě a podle toho, zda byly zbytky zaorány či ponechány volně na povrchu. Po zapravení do půdy se posklizňové zbytky rychleji rozkládají a populace patogena přežívá výrazně kratší dobu než u zbytků ponechaných volně na povrchu (Fatmi, Schaad, 2002). Gleason et al. (1991) uvádějí 24 měsíců jako dobu přežívání patogena v rostlinných zbytcích volně na povrchu pole a 7 měsíců ve zbytcích zapravených do půdy v Iowě, USA. Stejně tak Chang et al. (1992) ve státě Illinois, USA, udávají dobu přežívání bakterie ve zbytcích zapravených do půdy jako 7 měsíců. Fatmi, Schaad (2002) uvádějí v závislosti na lokalitě přežívání patogena v nezapravených rostlinných zbytcích 9-27 měsíců a 4-18 měsíců v zapravených rostlinných zbytcích v půdě.

Jiná je situace u přežívání patogena ve volné půdě bez přítomnosti rostlinných zbytků, kde přežívá pouze 3-6 týdnů (Kúdela et al., 2002).

Přežívání patogena v posklizňových zbytcích v půdě se stalo vážným problémem především v oblastech, kde jsou na polích či ve sklenících intenzivně pěstovány monokultury rajčat (Yogev et al., 2009). Například v regionu Besor v Izraeli jsou rajčata pěstovaná ve sklenících a pod fólií vysazována dvakrát ročně, a to na jaře a na podzim. V posledních letech se na tomto území vyskytuje choroba ve vysoké míře a to i navzdory intenzivnímu testování a certifikaci semen. Detekovány byly vždy dva stále stejné kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, což poukazuje na to, že primárním inokulem v každé nové sezóně nejsou infikovaná semena, nýbrž infikované rostlinné zbytky v půdě (Kleitman et al., 2008).

Kromě přímé infekce ze semene proniká patogen do rostliny přes poranění na kořenech a stoncích, která bývají způsobena kultivačními zásahy jako je přesazování rostlin či zaštipování postranních výhonů nebo například kroupami, hmyzem či jinými činiteli. Bakterie pronikne do xylému, kde se pomnoží a rozšíří se jím po celé rostlině.

V tomto případě hovoříme o systémové infekci. Patogen způsobí ucpání cév a ztrátu jejich funkčnosti, poté naruší cévní stěny a dostane se až do průvodního parenchymatického pletiva, kde způsobuje lýzu parenchymatických buněk a následnou tvorbu dutin uvnitř stonků a řapíků. Dutiny jsou vyplněny slizovitou žlutou hmotou, která je tvořena bakteriemi a zbytky buněčných stěn parenchymatických buněk. Bakteriální exsudát se dostává prasklinami až na povrch rostliny a vytváří tak zdroj inokula pro sekundární infekce. Sekundární šíření patogena je umožněno především závlahovou vodou nebo dešťovými kapkami, zejména při silném větru (Belli et al., 2007).

Bakterie tímto způsobem pronikají do dalších částí rostliny nebo do zdravých rostlin přes poranění, průduchy, lenticely, hydathody či mikroporanění například po odlomení trichomu. V tomto případě pak bakterie kolonizuje vnější parenchymatické pletivo a způsobuje místní nekrózy projevující se skvrnitostí rostlinných pletiv (Belli et al., 2007; Kúdela et al., 2002).

Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* jako mnoho dalších fytopatogenních bakterií přežívá také jako epifyt na povrchu rostlin (Hogenhout, Loria, 2008). Rezervoárem pro jeho epifytické přežívání a šíření jsou rostliny rajčat, a to především mladé lístky. Populace patogena přežívá jako epifyt i na dalších druzích rostlin čeledi *Solanaceae* i jiných čeledí (viz. Hostitelský okruh). Na okolní rostliny se šíří pomocí závlahové či dešťové vody, aplikací pesticidů a kultivačními zásahy, a způsobuje především lokální infekce projevující se okrajovými nekrózami listů a skvrnitostí plodů (Tsiantos, 1987).

Dalším významným faktorem přežívání a šíření *C. m. subsp. michiganensis* je kontaminované nářadí, opěry a nádoby. Na povrchu dřevěných kůlů nebo beden patogen přežívá při nízké vzdušné vlhkosti až 7-8 měsíců. Použití kontaminovaného nože či nehtu může způsobit šíření infekce při zaštipování vrcholu výhonů a terminálních pupenů. V neposlední řadě třeba poznamenat, že nejvhodnějším médiem pro šíření nákazy je závlahová voda, a to především při závlaze postřikem. Nutné je zmínit i hydroponický způsob pěstování rajčat, kde živný roztok představuje velkou příležitost pro šíření patogena (Kúdela et al., 2002).

Rozvoj choroby a její ekonomický dopad závisí na zdroji inokula a jeho objemu a na rozšíření patogena v porostu. To je ovlivněno podmínkami prostředí, kultivačními zásahy a formou ochranných opatření (Yogev et al., 2009). Šíření infekce a rychlému rozvoji choroby prospívá vysoká vzdušná vlhkost a teplota kolem 25-28 °C, obzvláště nastanou-li tyto podmínky po období výrazně nižších či vyšších teplot (Belli et al., 2007; Gleason et al., 1993).

2.7 Detekce a determinace patogena *C. m. subsp. michiganensis*

Identifikaci patogena většinou předchází jeho izolace a získání čisté kultury, ale v řadě případů lze detekovat patogena i bez izolace, tj. přímo v rostlinných pletivech. Identifikace bakterií se opírá především o kultivační, sérologické a genetické znaky či vlastnosti.

Presumptivní diagnostika se opírá o posouzení příznaků na rostlinách a znalost kultivačních zásahů a průběhu počasí, které předcházelo vzniku choroby. Pro následnou konfirmační diagnostiku platí zásada, že se musí opírat o výsledky několika různorodých identifikačních testů. Výsledky těchto testů se porovnávají s diagnostickými diferenciačními tabulkami uveřejněnými v bakteriologických příručkách. Identifikace pomocí počítače je většinou založena na principu numerické identifikace. Provede se pevně stanovený počet testů a výsledky se vyhodnotí počítačem tak, že konečná identifikace se uvádí s vypočtenou pravděpodobností. Pokud se dosáhne zvolené identifikační hodnoty, pak je testovaný kmen považován za identifikovaný (Kůdela et al., 2002).

2.7.1 IZOLACE

Základním předpokladem úspěšné izolace bakterie z nemocných rostlinných pletiv je použití vhodné techniky, výběr správného vzorku napadených pletiv k izolaci a použití vhodných živných médií. Důležité je také, aby vzorky rostlinného materiálu byly doručeny do laboratoře v co nejlepším stavu, proto je vhodné odebírat je co nejdříve před samotnou diagnózou, nebo je uchovat v chladničce při teplotě 4°C (Calzolari, 1986).

Nejvhodnějším místem pro odběr pletiv k izolaci je rozhraní mezi nekrotickým a živým pletivem. Obvykle odebíráme část stonku asi 2-3 cm pod zvadlými listy nebo lístky. Malý kousek infikovaného stonku nebo řapíku se umístí do sterilní vody v níž bakterie z cévních svazků vytečou (Kůdela et al., 2002). Cariddi (1997) doporučuje k izolaci používat exsudát vytlačený z uříznutého řapíku přímo do sterilní vody, spíše než kousky pletiva, z důvodu větší čistoty vzorku a eliminace přítomnosti kolonií jiných bakterií.

Vzorek je pak umístěn na pevné živné médium, kterým jsou různé typy živných agarových ploten, např. živný kvasničný agar (NBY), nebo kvasničnoglukosový agar (YDC), nebo kvasnično-pepton-glukózový agar (YPGA) a ponechá se kultivovat 72-96 hodin při teplotě 25°C. Následně je třeba získat čistou kulturu patogena. Jejím základem

jsou bakteriální buňky tvořící samostatnou kolonii, která pochází z jediné bakteriální buňky (Calzolari, 1986).

Čistou kulturu získáme přeočkováním vybrané kolonie patogena metodou tzv. křížového roztěru na agarové médium. K přípravě čisté kultury určené pro fyziologické, biochemické i jiné identifikační testy nelze použít selektivní média. Na těchto médiích totiž nežádoucí organismy sice nerostou, avšak mohou být v malém množství přítomny jako kontaminant a následně by mohly ovlivnit výsledky testů (Kůdela et al., 2002).

2.7.2 DETEKCE A IDENTIFIKACE

Od konce 80. let se při detekci a identifikaci bakterií začínají postupně uplatňovat nové metody, které analyzují strukturální elementy patogena, jako jsou nukleové kyseliny, polyaminy, proteiny, lipidy, mastné kyseliny a polysacharidy. Nové metody rychle zatlačují do pozadí pracné a zdlouhavé konvenční identifikační postupy (Kůdela et al., 2002).

2.7.2.1 Mikroskopické metody

Pozorování morfologických vlastností bakterií k jejich přesné determinaci nepostačuje, neboť poskytuje poměrně úzký prostor pro druhovou diferenciaci. Často je také morfologická identifikace ztěžována tvarovou proměnlivostí bakteriálních buněk. Mikroskopické metody tak mohou poskytovat jen orientační podklady, k nimž se při determinaci přihlíží jen v komplexu s výsledky dalších identifikačních testů (Kůdela et al., 2002).

2.7.2.2 Kultivační metody

Zaznamenává se velikost, tvar a pigmentace kolonií (makroskopická morfologie kolonií) vyrostlých na pevném médiu, rychlost růstu a tvorba slizu. *C. m. subsp. michiganensis* vytváří více či méně fluidní kolonie žluté barvy, lesklé, mírně vypouklé, kruhovitého půdorysu a s celistvým rovným okrajem. Optimální růstová teplota je 20-29°C, maximum 29-35°C (Cariddi, 1997).

Pro izolaci patogena se nejčastěji užívají semiselektivní média. To jsou taková média, která v sobě slučují vlastnosti diferenčních a selektivních médií, tedy poskytují možnost identifikovat bakterie podle charakteristických kolonií a částečně potlačují růst

jiných mikroorganismů tím, že obsahují živiny vhodné především pro růst „žádaného organismu“ (Kůdela et al., 2002).

Mezi jedním z prvních médií používaných k izolaci *C. m. subsp. michiganensis* ze semen bylo semiselektivní médium SCM navržené autory Fatmi a Schaad (1988), na kterém je možné detekovat jedno infikované semeno ve vzorku 10 000 semen. Toto médium bylo různými vědeckými pracovníky dále vylepšováno, aby se dosáhlo vyšší citlivosti a kratší kultivační doby u patogena, která se dle různých médií pohybuje od 3 do 12 dní.

V současné době je k dispozici větší množství semiselektivních médií pro kultivaci *C. m. subsp. michiganensis*, avšak žádné není stoprocentně spolehlivé, a proto se v diagnostických laboratořích často používá několik různých médií současně. Stanovení nejvhodnějšího média taktéž závisí na druhu analyzovaného vzorku. Záleží na tom, zda jsou rozborována semena, rostlinná pletiva nebo půdní vzorky a také na účelu diagnostiky, zda testování probíhá v běžné rostlinolékařské praxi nebo vědeckém výzkumu (Gleason et al., 1993).

2.7.2.3 Chemické metody

Klasickou chemickou identifikační metodou je **Gramovo barvení**. Podstata rozlišení bakterií na dvě skupiny spočívá v rozdílné struktuře buněčné stěny. Grampozitivní bakterie jsou barvitelné tryfenylmethanovým barvivem a roztokem jodidu draselného, kdežto gramnegativní nikoliv. Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je bakterie grampozitivní (Kůdela et al., 2002).

Analýza mastných kyselin (Fatty Acid Analysis – FAA)

V bakteriálních buňkách jsou pomocí plynové chromatografie zjišťovány kvalitativní rozdíly obsahu jednotlivých mastných kyselin a jejich vzájemný poměr. Pro každý taxon je charakteristický určitý profil mastných kyselin. Byl vyvinut vysoce standardizovaný postup extrakce mastných kyselin, analytický postup a software pro identifikaci. Databáze systému je v současnosti jedna z největších na světě. Bakterie se pěstují na standardním médiu a pro analýzu postačuje 40 mg vlhké hmotnosti buněk. Samotná identifikace proběhne během několika hodin. Nevýhodou analýzy mastných kyselin je potřeba drahého přístrojového vybavení a zkušeného personálu (Kůdela et al., 2002).

Gitaitis et al. (1991) vyvinuli rozsáhlou databázi profilů *C. m. subsp. michiganensis* pro tuto metodu, avšak uvádějí, že ve srovnání s použitím metody ELISA či semiselektivních médií je analýza mastných kyselin méně citlivá a především pracnější.

2.7.2.4 Biochemické metody

Těmito metodami se diferencují bakterie na základě schopnosti využívat zdroje uhlíku. Biochemické testy se původně prováděly v tekutých médiích ve zkumavkách. V posledním desetiletí byly místo nich vyvinuty standardizované miniaturizované multitestovací systémy, tzv. mikrotesty. Jedním z nich je speciální diagnostický systém **Biolog** (Biolog, Inc., Hayward, CA) využitelný pro fytopatogenní bakterie.

Do mikrotitračních destiček s 96 mikrozmkavkami, které představují 96 standardních mikrobiologických testů, je očkovaná suspenze buněk připravená z čisté kultury bakterií a po 24 hodinách je test vyhodnocen na základě zbarvení média v mikrozmkavkách. Pomocí počítače se analyzuje biochemický profil testované bakterie a stanoví se identifikace s uvedením pravděpodobnosti správnosti determinace. Tento systém výrazně zkrátí dobu potřebnou k identifikaci patogena. Další z komerčně vyráběných diagnostických souprav jsou tzv. **API-systémy** (API System, S. A.) (Kůdela et al., 2002).

2.7.2.5 Sérologické metody

Skříčková aglutinace

Testované bakterie suspendované v kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku se smíchají se specifickým antisérem. Reakce se vyhodnocuje pomocí světelného mikroskopu za 3-5 minut. Setká-li se antigen s homologní protilátkou, reakce je pozitivní a bakteriální buňky se spojují do shluků, neboli aglutinují (Kůdela et al., 2002).

Enzymová imunosorpční analýza (**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA**)

U této standardní sérologické metody se k vizualizaci reakcí antigenu testované bakterie s homologní protilátkou využívají enzymy (alkalická fosfatáza) konjugované s imunoglobuliny separovanými z antiséra. Stěny jamek polystyrenové destičky se povlečou antigenem obsaženém v rostlinném homogenátu a do jamek se přidá antisérum konjugované s enzymem. Přebytek antiséra se poté vymyje a do jamek se přidá substrát enzymu (roztok sodné soli p-nitrofenylfosfátu). Tento substrát je hydrolyzován enzymem vázaným na antisérum, činností enzymu se uvolní p-nitrofenol, který mění zbarvení reakční směsi. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci enzymu vázaného na

antigeny. Změnu barvy lze hodnotit vizuálně, intenzitu zbarvení fotometricky (Kůdela et al., 2002).

Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je poměrně jednotný taxon, který disponuje obvyklými společnými antigeny. To znamená, že jedna protilátka reaguje se všemi nebo s téměř všemi jeho kmeny. Specifická antiséra pro *C. m. subsp. michiganensis* jsou komerčně dostupná a využívána jak v metodě ELISA tak IFA (Alvarez, 2004).

ELISA patří k poměrně citlivým metodám, dokáže detekovat patogena už při množství 10^4 bakteriálních buněk v 1 ml suspenze a rovněž umožňuje jeho detekci přímo z rostlinného pletiva (Gitaitis et al., 1991). Nevýhodou této metody je, že neposkytuje žádné informace o životnosti buněk patogena a neumožňuje jeho izolaci (Calzolari, 1986; Gleason et al., 1993).

Imunofluorescence (Immunofluorescence Assay – IFA)

K vizualizaci reakcí antigenu na povrchu testované bakterie s homologní protilátkou se využívají barviva (např. fluorescein isothiokyanát – FITC). Barvivo konjuguje buď s příslušnou homologní protilátkou (přímé fluorescenční barvení), nebo s jinou protilátkou, která je vázána na prvně aplikovanou homologní protilátku (nepřímé fluorescenční barvení). V obou případech se přítomnost protilátek na povrchu homologních bakterií projeví jasně zelenou fluorescencí. Metoda se vyznačuje vysokou citlivostí, spojenou se schopností detekovat bakterie přímo v hostitelských pletivech. Výhodou je také možnost stanovení velikosti a tvaru bakteriálních buněk (Kůdela et al., 2002).

2.7.2.6 Molekulárněbiologické metody

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction – PCR)

Podstatou této metody je *in vitro* amplifikace specifických fragmentů DNA charakteristických pro patogena. Opakované cykly syntézy DNA zahrnují: teplotní denaturaci dvouřetězcové DNA testované bakterie, hybridizaci neboli připojení primerů (jednořetězcových specifických oligonukleotidů odvozených z DNA definovaného kmene bakterie), syntézu dvouřetězcové DNA za přítomnosti teplotně stabilní DNA-polymerázy a deoxynukleotidtrifosfátů, stavebních kamenů nukleové kyseliny. Díky své vysoké citlivosti (teoreticky může být detekována jedna kopie DNA ve vzorku) má uplatnění při detekci bakterií, které se nacházejí v rostlinných pletivech v nízkých koncentracích. Pokud by byly k dispozici primery ohraničující ty úseky DNA, které kódují patogenitu bakterií, mohla by

technika PCR eliminovat potřebu testů patogenity na rostlinách. PCR je přístrojově a materiálově náročnou metodou (Kúdela et al, 2002).

V současné době bylo popsáno množství PCR primerů pro detekci *C. m. subsp. michiganensis*. Například pomocí primerů, které vyvinul Dreier et.al. (1995) lze detekovat už 10^2 bakteriálních buněk v 1 ml. Avšak i přes velkou citlivost této metody stále dochází k falešným pozitivním i falešným negativním výsledkům (Kaneshiro, Alvarez, 2001). To je způsobeno tím, že obsah plazmidů u různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* je poměrně variabilní. Počet plazmidů v jedné bakteriální buňce bývá od nuly do tří, obvykle dva, avšak během manipulace a skladování vzorků mohou být některé plazmidy ztraceny (Chamot, Fulbright, 1988).

Výzkum se nyní soustředil na vývoj nových specifických a univerzálních PCR primerů, použitelných pro citlivou a spolehlivou detekci *C. m. subsp. michiganensis* v rostlinném materiálu. Tyto primery by měly být založeny na bázi chromozomálních markerů, aby byly stabilnější než v současnosti používané plazmidové markery, které nejsou zcela spolehlivé právě z důvodu možné ztráty plazmidů (Garteman et al., 2003).

2.7.2.7 Biologické testy

Nejdůležitější vlastností bakterií vyvolávajících choroby rostlin je jejich patogenita. Tuto vlastnost doposud nelze stanovit jinak než umělými infekcemi na živých rostlinách. Používají se při tom metody, které napodobují přirozenou infekci. Umělé infekce rostlin se uplatňují zejména při rozpoznání patovarů a ras bakterií, k zjištění patogenních vlastností, k rychlému odlišení patogena od saprofytů tzv. testem hypersenzitivity, a k odlišení virulentních a avirulentních kmenů patogena. Umělé infekce mají rovněž velký význam při stanovení hladiny rezistence či náchylnosti druhů a odrůd hostitelských rostlin a při testování účinnosti přípravků na ochranu rostlin (Kúdela et al., 2002).

Test hypersenzitivity

Tento test se používá k rychlému odlišení patogena od saprofytů a patří k nejčastěji aplikovaným testům při identifikaci patogena. Uplatňuje se bezprostředně po izolaci bakterií. Umožňuje redukovat potřebu dalších fyziologických a biochemických testů. Jeho předností je jednoduchost a časová nenáročnost, nevyžaduje sterilní podmínky a výsledky jsou relativně spolehlivé. Jako indikátorových rostlin k tomuto testu se užívá nehostitelských rostlin, nejčastěji tabáku (*Nicotiana tabaccum* L.) a nocenky (*Mirabilis jalapa* L.).

Vodní suspenze bakterií o koncentraci větší než $5 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml se injekční stříkačkou vpraví do mezizilkových pletiv listu. Odpovědí rostliny na invazi patogena je tzv. hypersenzitivní reakce, vyvolávající odumření buněk rostliny v místě inokulace. Patogen do 24 hodin způsobuje nekrózu v místě injikace a bezprostředním okolí, zatímco saprofyti nevyvolávají žádné příznaky (Berpohl et al., 1996).

Při použití tabáku jako indikátorové rostliny se však projev reakce liší po inokulaci různými kmeny *C. m. subsp. michiganensis* a také v závislosti na teplotě. Nocenka se díky své stálé a zřetelné reakci shodně pro všechny kmeny patogena a nezávislé na teplotě jeví jako vhodnější rostlina pro testy patogenity a je používána v mnoha podnicích. Reakce se projeví do 48 hodin po inokulaci (Gitaitis, 1990). Bylo prokázáno, že u nocenky vyvolávají hypersenzitivní reakci jen ty kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, které jsou schopny kolonizovat pletiva svého přirozeného hostitele, tedy rajčete (Berpohl et al., 1996).

Nocenka má však velmi tenké listy a inokulace bakteriální suspenze do pletiv mezofylu listu není vždy snadná a vyžaduje zkušenou ruku. Umesha et.al. (2008) po provedém výzkumu navrhl pro *C. m. subsp. michiganensis* jako vhodnou indikátorovou rostlinu rozchodník zvrhlý (*Sedum hybridum* L.) z čeledi *Crassulaceae*. Vykazuje stejnou hypersenzitivní reakci jako nocenka, a to do 24 hodin, a má silné listy, takže injikace patogena do nich je mnohem snadnější než do listů nocenky či tabáku. Rostlina se navíc dobře rozmnožuje a rychle roste.

Test patogenity na hostitelských rostlinách

Testy patogenity jsou nezbytné pro potvrzení identity a patogenity námi izolované bakterie. Provádí se ve sklenicích či klimatizovaných místnostech na zdravých rostlinkách rajčat, které se infikují získanou čistou kulturou bakterií. Jestliže se na rostlinách objeví symptomy bakteriálního vadnutí rajčete, potvrzuje to, že byl z původních napadených rostlin izolován *C. m. subsp. michiganensis*. (Calzolari, 1986).

Nevýhodou použití těchto testů je relativně dlouhý interval, a to 3 dny až několik týdnů mezi inokulací a objevením prvních příznaků (Gleason et al., 1993).

2.7.3 SHRnutí

V diagnostické praxi je důležité vybrat z desítek testů pro identifikaci bakterií jen ty nejvhodnější a nezbytné, které umožní rychle a jednoduchým postupem určit získané izoláty. Pro každý rod bakterií byla vypracována zvláštní strategie identifikace a doporučen soubor vhodných diferenciačních testů. Pro členské státy EPPO jsou závazné diagnostické

protokoly, které se publikují v časopise Bulletin OEPP/EPPO jako „Approved EPPO Standards“ (Kúdela et al, 2002).

Byl a je prováděn rozsáhlý výzkum pro vývoj rychlých, citlivých a specifických technik pro detekci *C. m. subsp. michiganensis* a pro zajištění co nejvyšší míry ochrany proti chorobě kterou způsobuje (León et.al., 2006).

Organizace EPPO a ISHI (The International Seed Health Initiative for Vegetables) navrhly jako hlavní proceduru pro detekci *C. m. subsp. michiganensis* kultivaci na semiselektivních médiích následovanou identifikací podezřelých kolonií. Ta musí být provedena použitím nejméně dvou různých identifikačních metod založených na rozdílných vlastnostech patogena. V souladu s těmito diagnostickými protokoly pro potvrzení pozitivní diagnózy musí být patogen izolován z rostlinného pletiva včetně semen. (EPPO/CABI, 2005; ISHI, 2005).

V současnosti se pro následnou identifikaci jako doplňující metody nejčastěji používají ELISA, IFA a PCR, avšak kultivace na semiselektivních médiích je stále zapotřebí pro získání čistých kultur a následné testy patogenity na rostlinách .

Problémem při izolaci patogena na živném médiu je to, že kolonie *C. m. subsp. michiganensis* rostou pomalu a primární izolace na YPGA médiu vyžaduje 96 hodin, zatímco kolonie saprofytických bakterií se vyvíjí za méně než 48 hodin. Při použití semiselektivního média je pro vývoj *C. m. subsp. michiganensis* zapotřebí ještě více času, a to až 10 dní i více. Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* může být inhibována jinými mikroorganismy, a to i v případě použití semiselektivního média. Navíc tato média jsou náročná na přípravu a jsou drahá (Gleason et al., 1993).

Různé diagnostické techniky používané pro detekci *C. m. subsp. michiganensis* mají své výhody a nevýhody spojené s jejich citlivostí a časovou náročností. Rychlé a citlivé metody jako ELISA, IFA a PCR neumožňují izolaci patogena a neposkytují žádné informace o životnosti bakteriálních buněk. Kultivace patogena na živných médiích a následné biologické testy patogenity jsou zase časově náročné a izolace patogena může být ztížena růstem jiných mikroorganismů (León et al., 2006).

Jako alternativní řešení detekce *C. m. subsp. michiganensis* bylo navrženo použití **metody imunomagnetické separace (IMS)**, což je varianta imunoizolační techniky (León et al., 2006). Imunoizolační technika v sobě zahrnuje sérologickou metodu a kultivaci na agarovém médiu. Užívají se skleněná nebo plastová zrnka, která jsou potažena specifickými protilátkami umožňujícími selektivní zachycení bakteriálních buněk

z rostlinného extraktu. Navázané bakterie jsou poté desorbovány do malého množství roztoku a kultivovány na živném médiu (Gleason et al., 1993).

Metoda IMS tedy spojuje výhody sérologické detekce patogena a růstu charakteristických kolonií na živném médiu, usnadňujíc izolaci patogena potřebnou k pozitivní diagnóze. Byla již testována pro použití v klinické mikrobiologii, mikrobiologii potravin a veterinární medicíně a je využitelná i pro detekci některých fytopatogenních bakterií, avšak její aplikace není zatím běžná. Bylo prokázáno, že tato metoda významně zvyšuje citlivost při detekci a izolaci patogena z rostlinných pletiv. Metoda IMS se dá kombinovat i s PCR, což zvýší citlivost metody PCR, avšak použití metody IMS a následná kultivace patogena je citlivější než kombinace IMS a PCR (León et al., 2006).

Díky využití metody IMS dojde k významnému snížení růstu saprofytických bakterií a můžeme tak kultivovat *C. m. subsp. michiganensis* i na neselektivních médiích, čímž se výrazně zkrátí čas kultivace oproti použití semiselektivních médií a citlivost metody je dokonce vyšší než samotné využívání semiselektivních médií.

V souhrnu je IMS umožňující izolaci *C. m. michiganensis* z rostlinných vzorků včetně semen na neselektivním médiu jednoduchá, rychlá a citlivá metoda, která nevyžaduje drahé přístrojové vybavení ani zkušenou obsluhu. I když ještě musí být podrobena dalšímu výzkumu pro praktické použití v širším měřítku, jeví se zatím jako vhodná alternativní metoda k současně používaným diagnostickým metodám v běžné fytopatologické praxi (León et al., 2006).

2.8 Ochrana rajčat proti infekci patogenem *C. m. subsp. michiganensis*

Principy ochrany proti *C. m. subsp. michiganensis* jsou v podstatě stejné jako u ostatních infekčních chorob. Ochrana spočívá v redukci množství inokula, a to eliminací zdrojů primární infekce, zamezením či omezením šíření nákazy a likvidací nebo redukcí zdrojů sekundární infekce. Dalšími důležitými faktory jsou zvýšení odolnosti rostlin a vytvoření prostředí, které je nepříznivé pro množení a šíření patogena, vznik infekce a rozvoj choroby (Kúdela et al., 2002). Stejně jako u jiných bakterióz je ochrana proti bakteriálnímu vadnutí rajčete založena především na preventivních opatřeních (Belli et al., 2007).

2.8.1 PĚSTITELSKÁ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

V případě boje proti infekci *C. m. subsp. michiganensis* je jedním z nejpodstatnějších opatření používání zdravých a nakažoprostých certifikovaných semen a sazenic (Kleitman et al., 2008). Osivo by mělo pocházet ze semenářských porostů v suchých oblastech prostých patogena. Semena by měla být získávána kvašením plodů a doporučuje se i jejich následná povrchová dezinfekce chemickými či fyzikálními prostředky (Kokošková, 2008). Jako nejúčinnější se jeví ponoření semen do roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6% nebo do roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,6% po dobu jedné až dvou hodin, případně jejich ponoření do roztoku chlornanu sodného o koncentraci 0,5% na dobu deset minut. Semena jsou poté opláchnuta v tekoucí vodě a ponechána k osušení ve stínu (Kokošková, 2008; Calzolari, 1986). Z fyzikálních metod se uplatňuje ošetření semen ponořením do vody o teplotě 55-56 °C na dobu 30 minut (Belli et al., 2007; Calzolari, 1986).

Pouhé použití zdravého osiva však není dostačující ochranou proti nákaze bakterií *C. m. subsp. michiganensis* z důvodu dlouhé doby jejího přežívání v rostlinných zbytcích, a to jak na povrchu, tak v půdě. Zbytky infikovaných rostlin představují zdroj infekce pro zdravé sazenice vysazené v další sezóně (Fatmi, Schaad, 2002).

Dalšími důležitými faktory, na které je třeba brát zřetel v ochraně proti infekci *C. m. subsp. michiganensis* jsou tedy rostlinné zbytky a půda. V polních porostech je třeba řádně dodržovat osevní postup a vyloučit pěstování hostitelských rostlin na stejném pozemku po dobu čtyř až pěti let. Ve sklenících je nezbytná sterilizace půdního substrátu, například párou o teplotě 80°C minimálně 30 minut, a pečlivý sběr a likvidace rostlinných zbytků. (Kokošková, 2008; Scortichini, Stravato, 1989).

Dezinfekci půdy lze provádět buď pomocí biofumigace nebo solarizací, či kombinací obou metod. Pro zvýšení ochranného efektu by měly být plyny uvolněné po aplikaci biofumigantu udrženy v terénu po dobu nejméně dvou týdnů. V polních podmínkách je třeba biofumigant zapravit rovnoměrně do půdy, provést závlivku a pozemek zakrýt fólií, aby se zvýšilo působení vyprodukovaných plynů a vzrostla teplota půdy. Rostlinné zbytky je také možno zaorat, obzvláště je-li v půdě vysoký obsah organického materiálu, například rašeliny, dojde k jejich urychlenému rozkladu a eliminaci patogena působením půdních mikroorganismů, především komplexů hub a antagonistických bakterií rodů *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Streptomyces* (Zanón, Jordá, 2008).

Ještě lepších výsledků než s rašelinou bylo dosaženo zapravováním kompostu do půdy. Kompost je obnovitelným zdrojem založeným na rostlinných zbytcích a omezuje potřebu jejich pálení či skládkování. Kompostováním za dostatečně vysokých teplot dochází k eradikaci *C. m. subsp. michiganensis* z infikovaných rostlinných zbytků. Přidáním kompostu do půdy se zvýší její přirozená supresivita, což je vlastnost, která potlačuje patogena působením půdních mikroorganismů. Bylo zjištěno, že kompost má schopnost potlačovat jak houbové tak bakteriální patogeny v půdě a současně má i pozitivní vliv na výši výnosu a jeho používání by mělo být zahrnuto mezi metodami integrované ochrany proti bakteriálnímu vadnutí rajčete (Yogev et al., 2009).

Mezi další preventivní opatření v ochraně proti infekci bakterií *C. m. subsp. michiganensis* patří důsledná hygiena a dezinfekce používaných nádob, nářadí i rukou při všech kultivačních zásazích, především při zaštipování výhonů (Kokošková, 2008). Pro omezení podmínek vhodných pro šíření patogena by porost rajčat neměl být příliš hustý a rostlinám by měla být poskytnuta vyvážená výživa. Především by se mělo zabránit přehnojení dusíkem, které podporuje bakteriální infekci zejména tím, že zvyšuje nasycenost rostlinných pletiv vodou, zvětšuje se průduchová skulina a pronikání bakterií do rostliny a jejich další šíření je pak snazší (Kúdela et al., 2002). Závlahu rostlin je opět z důvodu omezení šíření bakterií vhodné provádět podmokem a nikoliv postřikem (Belli et al., 2007).

2.8.2 CHEMICKÁ OCHRANA

I přes všechna prováděná preventivní opatření se však choroba může vyskytnout v porostu rajčat. V tomto případě by pak další opatření měla směřovat ke snížení ztrát na výnosu a k zabránění dalšímu šíření patogena. Poté, co se choroba objeví a obzvláště za přítomnosti vhodných podmínek k jejímu rozvoji a šíření, jsou současně dostupné možnosti ochrany jen částečně účinné (Hausbeck et al., 2000).

Chemická ochrana proti bakteriálním patogenům není tak účinná jako proti původcům mykóz, a to nejen z důvodu, že bakterie se množí nesrovnatelně rychleji než houby, ale i proto, že v ontogenezi bakterií chybí zranitelné stádium srovnatelné s klíčením spor u hub. *C. m. subsp. michiganensis* je navíc grampozitivní bakterie, která hojně produkuje exocelulární polysacharidy, jež ji dobře chrání před účinky baktericidních látek (Kúdela et al., 2002).

Při výskytu choroby v porostu může být sekundární šíření patogena omezeno ošetřením rostlin některými chemickými látkami. K tradičním anorganickým baktericidům

patří měďnaté sloučeniny, které zabraňují šíření patogena a omezují projev symptomů choroby jako jsou nekrózy listů a skvrny na plodech (Gleason et al., 1993). Účinnými látkami v těchto sloučeninách jsou oxychlorid měďnatý, hydroxid měďnatý, síran měďnatý a 8-chinolinol. Používá se i bordeauxská jícha, což je směs komplexních solí síranu měďnatého, hydroxidu měďnatého a hydroxidu vápenatého (Kůdela et al., 2002). Častým používáním měďnatých přípravků však postupně vzrůstá tolerance fytopatogenních bakterií k mědi. Jejich dlouhodobé používání navíc vede k akumulaci mědi v půdě, což má za následek negativní působení na rostliny i životní prostředí (Ninot et al., 2002).

Jako nejúčinnější látky zabraňující šíření bakterie *C. m. subsp. michiganensis* a rozvoj sekundární infekce se ukázaly síran měďnatý a 8-chinolinol, který v kombinaci se síranem měďnatým vykazuje synergistický efekt. Kombinací těchto dvou účinných látek bylo při použití jejich polovičních koncentrací dosaženo vyššího efektu na redukci symptomů bakteriálního vadnutí rajčete než při použití pouze jedné z nich. Aplikací kombinace síranu měďnatého s 8-chinolinem tak lze omezit šíření patogena a snížit riziko nových infekcí, případně zmírnit projev choroby na rostlinách bez použití zbytečně vysokých dávek mědi (León et al., 2008).

Synergistický efekt byl prokázán rovněž při použití měďnatých přípravků s mancozebem, který samotný nezabraňuje šíření patogena, ale zvyšuje účinnost měďnatých přípravků (Hausbeck et al., 2000). Při výskytu choroby by měly být měďnaté přípravky do porostu rajčat aplikovány v sedmi až desetidenních intervalech (Kokošková, 2008).

Dalšími chemickými látkami účinnými proti *C. m. subsp. michiganensis* jsou antibiotika, obzvláště streptomycin. Jeho použití, jakož i použití některých dalších antibiotik není však ve většině států Evropské unie povoleno. Kasugamycin, který je v Evropské unii registrován pro použití v zemědělství a doporučován pro ochranu proti bakteriálním chorobám se proti *C. m. subsp. michiganensis* prokázal jako neúčinný (Theodoro, Maringoni, 2000).

Žádná z chemických látek používaná v ochraně proti infekci *C. m. subsp. michiganensis* však neuzdravuje napadené rostliny, mohou být používány pouze jako prevence proti šíření patogena a pro snížení projevů napadení rostlin, pokud se již choroba vyskytla v porostu, a to obzvláště v podmínkách, které jsou vhodné pro šíření patogena (Gleason et al., 1993).

2.8.3 ALTERNATIVNÍ ZPŮSOBY OCHRANY

Nárůst informovanosti a obecného povědomí o zdravotních a environmentálních rizicích vztahujících se k používání chemických pesticidů vedl k poptávce po nekonvenčních přípravcích biologického původu pro ochranu proti chorobám rostlin. Antibakteriální směsi rostlinného původu by mohly být jedním ze způsobů integrované ochrany rostlin díky svým ekologicky příznivým vlastnostem (Bolkan, Reinert, 1994).

Jednou z alternativ v ochraně proti bakteriálnímu vadnutí rajčete by mohlo být využití propolis, neboli včelího tmelu. Je to látka pryskyřičné povahy, kterou včely získávají z rostlinných zdrojů a je známá svým antibakteriálním působením, které je předmětem rozsáhlého výzkumu (Marcucci, 1995). V různých pokusech s touto substancí bylo zjištěno, že je účinná proti grampozitivním bakteriím, nemá žádný toxický dopad ani nezanechává nežádoucí pach či příchut' na potravinách. Výsledky pokusů, ve kterých byl zahrnut jako jeden z fytopatogenů i *C. m. subsp. michiganensis* se jeví jako slibné v potenciálním využití této látky pro ochranu rostlin proti bakteriózám, především při ošetření semen (Basim et al., 2006).

Jako další z možných alternativ nabízející se pro použití v biologické ochraně rajčat byla označena bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Byla ověřena jako významný antagonista některých fytopatogenních bakterií, mezi nimi i *C. m. subsp. michiganensis*. (Umesha, 2006). U rostlin rajčat inokulovaných *P. fluorescens* byl pozorován nárůst biomasy, zvýšení hmotnosti plodů a výnosu (Amara et al., 1996). Ošetření semen touto bakterií také zlepšuje kvalitu semen, významně zvyšuje jejich klíčivost a redukuje výskyt bakteriálního vadnutí rajčete v polních podmínkách. Její použití by tak mohlo být efektivně začleněno mezi další prostředky ochrany rajčat proti *C. m. subsp. michiganensis* (Umesha, 2006).

Další přírodní látky, které vykazaly účinnost proti bakterii *C. m. subsp. michiganensis* jsou rostlinné esenciální oleje (Daferera et al., 2003; Kokošková et al., 2007; Pouvová et al., 2008) a látky obsažené v pryskyřičném exsudátu z *Heliotropium sinuatum* (Modak et al., 2004). Tyto látky však zatím byly testovány pouze *in vitro* a jejich účinnost *in vivo* zatím ještě nebyla hodnocena (León et al., 2008).

2.8.4 FYTOSANITÁRNÍ OPATŘENÍ

Již po mnoho let probíhá výzkum týkající se genetické rezistence rajčat k bakteriálnímu vadnutí a rakovině. Pokusy o vývoj rezistentních odrůd však až do současné doby nebyly příliš úspěšné. Ačkoliv některé odrůdy vykazující určitou míru rezistence byly již vyšlechtěny, nebyly doposud rozšířené na trh a komerčně se nevyužívají (León et al., 2008). Z tohoto důvodu jsou hlavními metodami boje proti šíření této choroby fyto-sanitární a výše zmíněná preventivní opatření.

Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je ve státech Evropské unie, Spojených státech amerických a mnoha dalších zemích, kde se pěstují rajčata, evidována jako karanténní organismus (Gartemann et al., 2003).

V Evropské unii musí být semena rajčat získávána vhodnou kyselinoextrakční metodou a musí pocházet ze semenářských porostů z oblastí, kde se nevyskytuje bakteriální vadnutí rajčete, nebo musí pocházet z rostlin, na kterých se neobjevily symptomy této choroby po celou délku vegetačního období, nebo musí být certifikována jako prostá choroby po provedení oficiálních testů na vzorcích semen vhodnými detekčními metodami (Council Directive, 2000).

Organizace ISHI a EPPO (2005) navrhly jako hlavní metody pro zjištění přítomnosti *C. m. subsp. michiganensis* v semenech rajčat kultivaci na semiselektivním médiu následovanou identifikací podezřelých kolonií.

Bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je organizací EPPO řazena do seznamu A2, což je seznam škodlivých organismů vyskytujících se v některých členských zemích EPPO, které je doporučeno evidovat a zacházet s nimi jako s karanténními organismy (EPPO/CABI, 2005; ISHI, 2005). V Evropské unii tento patogen podléhá všem zákonem daným fyto-sanitárním opatřením na ochranu proti původcům bakterií, která spočívají v ohlašovací povinnosti, zákazu dovozu a průvozu, mimořádných rostlinolékařských opatřeních a rostlinolékařském dozoru (European Union, 1995).

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda morfologická variabilita různých kmenů *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* má vliv na metabolickou aktivitu a virulenci tohoto patogena.

Dílčí cíle:

1. Posouzení morfologické variability u kmenů *C. m. subsp. michiganensis*
2. Ověření metabolické aktivity fluidních, případně nefluidních kmenů *C. m. subsp. michiganensis*
3. Ověření virulence fluidních a nefluidních kmenů *C. m. subsp. michiganensis* v testech patogenity
4. Matematické a statistické zpracování výsledků

4 Materiál a metody

4.1 Použité bakteriální kmeny

Pro testování byly použity bakteriální kmeny *C. m. subsp. michiganensis* pocházející ze tří sbírek, a to z České sbírky mikroorganismů (CCM – Czech Collection of Microorganisms, Brno), z české sbírky oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. – Praha (RICP – Research Institute of Crop Production; CRI – Crop Research Institute) a z Belgické koordinační sbírky mikroorganismů (BCCM/LMG – Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, Gent).

Kmeny *C. m. subsp. michiganensis* testované pomocí metody Biolog Bacteria: CRI 7002, CRI 7005, CRI 7006, CRI 7007, CRI 7008, CRI 7009, CRI 7010, CRI 7011, CRI 7018, CRI 7021, CRI 7022, CRI 7024, CRI 7026, CRI 7029, CRI 7030, CRI 7032, CRI 7033, CRI 7034, CRI 7035, CRI 7036, CRI 7161, CRI 7163, CRI 7164, CRI 7168, CRI 7170, CRI 7172, CRI 7173, CRI 7174, CRI 7175, CRI 7176 a CRI 7177.

Kmeny *C. m. subsp. michiganensis* zařazené do testů patogenity na rostlinách rajčete: LMG 3685, LMG 5727, LMG 7333, RICP 218, RICP 5065, RICP 5068, RICP 5074, CRI 8050, CRI 8057, CRI 8078 a CRI 8084.

4.2 Kultivace patogena na umělých živných médiích

Všechny vybrané kmeny bakterie *C. m. subsp. michiganensis* byly kultivovány v Petriho miskách s průměrem 90 mm na ztuženém kultivačním médiu, konkrétně na MPA neboli masopeptonovém agaru. Toto médium je univerzální živná půda, kterou lze použít pro izolaci velkého počtu různorodých mikrobiálních druhů a slouží jako základ selektivně diagnostických půd. Médium MPA bylo připraveno následujícím způsobem: V 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 10 g masového výtažku, 10 g peptonu, 5 g chloridu sodného a 20 g agaru. Poté se upravilo pH na 7,2 a směs byla krátce povařena a poté sterilizována v autoklávu po dobu 30 minut při 121 °C. Po ochlazení na teplotu 45-50 °C bylo médium rozlito do sterilních P. misek do výšky 3-4 mm a ponecháno ztuhnout a nakonec dosušeno v obrácené poloze.

Bakteriální kultury byly očkovány na agarové plotny vyžíhanou očkovací kličkou. P. misky se zaočkovanou bakteriální kulturou byly označeny číslem kmene a datem a uloženy do klimaboxu k inkubaci. Inkubace *C. m. subsp. michiganensis* probíhala 4 dny

při teplotě 23 °C. Po 4 dnech se vždy provedlo přeočkování na nové agarové plotny. Narostlé bakteriální kolonie byly dle jejich makroskopické morfologie vizuálně hodnoceny pod stereomikroskopem jako fluidní, nefluidní či intermediální.

4.3 Testování metabolické aktivity patogena metodou Biolog Bacteria

Metabolická aktivita jednotlivých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* byla testována pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria (Inc. co., USA) s využitím počítačového programu MicroLogTM2 verze 4.01B a databáze pro grampozitivní bakterie. Byly používány Biolog destičky pro grampozitivní bakterie GP2 MicroplateTM. Mikrodestičky obsahující 96 jamek jsou potaženy různými uhlíkatými substráty a barvivem. Po inokulaci čistou kulturou dojde ke specifickému zbarvení jednotlivých jamek, pomocí kterého se poté analyzuje biochemický profil testovaného mikroorganismu a provede se jeho identifikace.

Pro testování byly používány čtyřdenní kultury jednotlivých kmenů *C. m. subsp. michiganensis*. Do baněk o objemu 25 ml obsahujících 10-15 ml fyziologického roztoku byly přidány vzorky bakteriálních kultur jednotlivých kmenů patogena a baňky byly umístěny na třepačku pro úplné promíchání bakteriální kultury s fyziologickým roztokem. Vzniklé bakteriální suspenze byly proměřeny ve spektrofotometru na výslednou turbiditu 20 % při 590 nm. Jako standard v první kyvetě byl použit samotný fyziologický roztok. Bakteriální suspenze byla dále přelita z baněk do misek a z nich pak pipetou přenesena do jamek mikrodestiček Biolog, do každé destičky jeden kmen patogena. Destičky byly označeny popisky a vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při teplotě 28 °C.

Vyhodnocení testu se provádělo po 24 hodinách. Intenzita zbarvení jednotlivých jamek mikrodestičky se hodnotila vizuálně a zapisovala se jako pozitivní, negativní či intermediální. Identifikace patogena pak byla provedena na základě posouzení zbarvení jamek mikrodestiček pomocí počítačového programu MicroLogTM2 od firmy Biolog Bacteria s využitím databáze pro grampozitivní bakterie. Podle identifikačního kritéria firmy Biolog Bacteria se identifikace kmenů provádí na základě indexu podobnosti (SIM=index similarity), který se pohybuje v rozmezí od 0,00 – 1,00. Kmeny jsou identifikovány, pokud SIM je v rozmezí 0,50 až 1,00 a neidentifikovány, pokud je SIM pod hranicí 0,50.

4.4 Biologické testy

K testům patogenity *C. m. subsp. michiganensis* na hostitelských rostlinách byly použity rostliny rajčete (*Lycopersicon esculentum* L.) náchylné odrůdy Šejk. Rostliny byly pěstovány v karanténním skleníku odd. bakteriologie, VÚRV, v.v.i. od jara do podzimu roku 2008. Byly umístěny v klimatizovaném boxu při teplotě 25 +/- 1°C a stálé vzdušné vlhkosti. Tam se prováděly i testy patogenity.

Jako inokulum byla použita čtyřdenní bakteriální kultura výše uvedených kmenů *C. m. subsp. michiganensis* kultivovaných na MPA médiu. Bakteriální kolonie byly přeneseny do baňek s vysterilizovanou destilovanou vodou a ředěny na výsledný objem 15 - 20 ml. Baňky byly poté ponechány několik minut na třepačce, kde došlo k vytvoření bakteriálních suspenzí. Ty pak byly proměřovány na spektrofotometru a od každého kmene byla připravena bakteriální suspenze o výsledné optické hustotě inokula OD = 0,1 a OD = 0,3 při vlnové délce 620 nm. Jako standard v 1. kyvetě byla použita samotná destilovaná voda. Po optimalizaci metody na rostlinách rajčete bylo dále používáno inokulum v OD = 0,3.

Rostliny rajčat byly inokulovány ve fázi 2 – 3 pravých listů. Malé množství bakteriální suspenze bylo vpraveno pomocí injekční stříkačky do paždí prvního a druhého pravého listu, tedy dva vpichy do každé rostliny. Každý z uvedených kmenů *C. m. subsp. michiganensis* byl testován vždy na 12 rostlinách. Jako negativní kontrola byly použity rostliny, do kterých byla injikována destilovaná voda. Pozitivní kontrolou byly rostliny inokulované sbírkovým kmenem LMG 5727, který byl testován na 12 rostlinách celkem třikrát. Každá inokulovaná rostlina byla označena pořadovým číslem a skupiny rostlin inokulované stejným kmenem patogena byly označeny číslem tohoto kmene a prostorově odděleny od skupin rostlin inokulovaných jinými kmeny patogena.

Testy byly vyhodnocovány 2 týdny po inokulaci. Hodnocení se provádělo vizuálně podle symptomů choroby (**viz. Přílohy Obr.3**) za pomoci čtyřbodové stupnice napadení znázorněné v tabulce 1. Příznaky, pozorované na rostlinách, jako vadnutí a usychání jednotlivých lístků, listů, stonku či celé rostliny, byly zaznamenány. Po vyhodnocení testů byly infikované rostliny zlikvidovány a použité květináče, nářadí a pěstební nádoby byly vydezinfikovány chlornanem sodným.

Tabulka 1 Stupnice napadení jednotlivých rostlin rajčete po inokulaci testovanými kmeny *C. m. subsp. michiganensis*

Stupeň napadení rostliny	Symptomy	Procentické napadení rostliny
1	Zdravá rostlina bez viditelných příznaků choroby	0%
2	Vadnutí jednotlivých lístků zpeřených listů	< 30%
3	Vadnutí a usychání celých listů	< 50%
4	Vadnutí a usychání listů i stonku, usychání celé rostliny	>50%

Pro hodnocení stupně virulence každého testovaného kmene byl vypočítán koeficient napadení podle vzorce $KN = (1.n_1 + 2.n_2 + 3.n_3 + 4.n_4) / n$.

KN – koeficient napadení

n₁, n₂, n₃, n₄ – počet rostlin vykazujících stupeň napadení 1,2,3 a 4

n – celkový počet rostlin inokulovaných daným kmenem *C. m. subsp. michiganensis*

Dále byla pro stupeň virulence každého testovaného kmene stanovena směrodatná odchylka a nakonec byla provedena analýza rozptylu jednoduchého třídění (ANOVA) s provedením podrobnějšího vyhodnocení tzv. Scheffé-ho metodou. Pomocí této metody byla vyhodnocena průkaznost rozdílů ve virulenci jednotlivých testovaných kmenů *C. m. subsp. michiganensis*. Veškeré výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel a programu Statistika.

5 Výsledky

5.1 Makroskopické hodnocení bakteriálních kolonií *C. m. subsp. michiganensis*

Vybrané kmeny bakterie *C. m. subsp. michiganensis* byly kultivovány na ztuženém médiu MPA. U narostlých bakteriálních kolonií byla hodnocena jejich makroskopická morfologie. Všechny kolonie vykazovaly typické charakteristiky pro daný druh. Odpovídaly literárnímu popisu, byly mírně vyklenuté, lesklé, s hladkým okrajem a žlutavého zbarvení. Vlastností, ve které se kolonie jednotlivých kmenů lišily, byla jejich fluidita, která souvisela s tvorbou bakteriálního slizu. Kolonie některých kmenů byly velmi fluidní neboli mukózní, naopak kolonie jiných kmenů se jevíly jako nefluidní neboli matné a drsné (**viz. Přílohy Obr. 7, 8**). Některé kmeny vytvářely kolonie, které nevykazovaly vlastnosti ani typicky fluidní ani nefluidní. Takové kolonie byly označeny jako intermediální neboli semifluidní. Údaje o fluiditě jednotlivých testovaných kmenů *C. m. subsp. michiganensis* jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2 Morfologie kmenů *C. m. subsp. michiganensis* ověřovaných v biologických testech na rostlinách rajčete

Pořadové číslo	Číslo kmene	Morfologie kolonií
1.	LMG 5727	Fluidní
2.	LMG 3685	Intermediální
3.	LMG 7333	Fluidní
4.	RICP 218	Fluidní
5.	RICP 5065	Fluidní
6.	RICP 5068	Intermediální
7.	RICP 5074	Nefluidní
8.	CRI 8050	Nefluidní
9.	CRI 8057	Intermediální
10.	CRI 8078	Fluidní
11.	CRI 8084	Fluidní

5.2 Vyhodnocení identifikace různých kmenů *C. m.* subsp. *michiganensis* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Čtyřdenní kultury vybraných kmenů *C. m.* subsp. *michiganensis* byly podrobeny testování identifikační metodou Biolog Bacteria. Z 31 testovaných kmenů byl pouze jeden kmen, a to kmen č. CRI 7011 identifikován jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tedy až na úroveň poddruhu (**viz. Přílohy Tab. 8**). Dalších deset kmenů, konkrétně kmeny CRI 7002, CRI 7005, CRI 7009, CRI 7010, CRI 7018, CRI 7026, CRI 7030, CRI 7033, CRI 7034 a CRI 7163 byly identifikovány jako *Clavibacter michiganensis*, tedy na úroveň druhu. Poddruhy identifikované touto metodou (*tessellarius*, *insidiosus* a *nebraskensis*) neodpovídaly skutečnosti (**viz. Přílohy Tab. 9, 10**). Osm dalších kmenů, konkrétně kmeny CRI 7021, CRI 7022, CRI 7036, CRI 7164, CRI 7168, CRI 7170, CRI 7174 a CRI 7177 byly označeny jako *Clavibacter michiganensis*, avšak index podobnosti nedosáhl hodnoty 0,5 a tak byly tyto kmeny považovány za neidentifikované (**viz. Přílohy Tab. 11**). Dvanáct zbylých kmenů, konkrétně kmeny CRI 7006, CRI 7007, CRI 7008, CRI 7024, CRI 7029, CRI 7032, CRI 7035, CRI 7161, CRI 7172, CRI 7173, CRI 7175 a CRI 7176 byly identifikovány jako jiné grampozitivní bakterie, nebyly tedy identifikovány ani na úrovni rodu *Clavibacter* (**viz. Přílohy Tab. 12**).

Celkově tedy z 31 testovaných kmenů byl 1 kmen identifikován na úroveň poddruhu, 10 kmenů bylo identifikováno na úroveň druhu a 20 kmenů nebylo identifikováno. V procentickém vyjádření to odpovídá 3,3 % kmenů identifikovaných až na úroveň poddruhu, 32,2 % kmenů identifikovaných na úroveň druhu a 64,5 % kmenů neidentifikovaných.

Údaje o identifikaci testovaných kmenů *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* jsou přehledně zaznamenány v tabulce 3, kde znaménko plus (+) značí identifikovaný taxon, znaménko mínus (–) neidentifikovaný taxon. Index podobnosti (similarity index = SIM) dosahuje hodnot 0,00–1,00. Při hodnotě $\geq 0,50$ byl druh či poddruh identifikován, při hodnotě $< 0,50$ nikoliv. Hodnoty SIM $\geq 0,50$ jsou označeny tučným písmem. Zkratka SIM *C. m.* znamená index podobnosti pro druh *Clavibacter michiganensis*, zkratka SIM *C. m. m.* představuje index podobnosti pro poddruh *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Tabulka 3 Identifikace *C. m. subsp. michiganensis* mikrobiálním identifikačním systémem
Biolog Bacteria

Poř. č.	Číslo kmene CRI	<i>Clavibacter</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	SIM <i>C. m.</i>	Identifikovaný subspecies	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.	SIM <i>C. m. m.</i>
1.	7002	+	+	0,884	<i>tessellarius</i>	-	0,019
2.	7005	+	+	0,678	<i>tessellarius</i>	-	0,070
3.	7006	-	-	-	-	-	-
4.	7007	-	-	-	-	-	-
5.	7008	-	-	-	-	-	-
6.	7009	+	+	0,995	<i>tessellarius</i>	-	-
7.	7010	+	+	0,862	<i>tessellarius</i>	-	-
8.	7011	+	+	0,532	<i>michiganensis</i>	+	0,532
9.	7018	+	+	0,724	<i>tessellarius</i>	-	-
10.	7021	-	-	0,442	<i>tessellarius</i>	-	-
11.	7022	-	-	0,163	<i>nebraskensis</i>	-	-
12.	7024	-	-	-	-	-	-
13.	7026	+	+	0,919	<i>tessellarius</i>	-	-
14.	7029	-	-	-	-	-	-
15.	7030	+	+	0,951	<i>tessellarius</i>	-	0,008
16.	7032	-	-	-	-	-	-
17.	7033	+	+	0,878	<i>nebraskensis</i>	-	-
18.	7034	+	+	0,824	<i>nebraskensis</i>	-	-
19.	7035	-	-	-	-	-	-
20.	7036	-	-	0,166	<i>tessellarius</i>	-	0,002
21.	7161	-	-	-	-	-	-
22.	7163	+	+	0,545	<i>tessellarius</i>	-	0,017
23.	7164	-	-	0,486	<i>tessellarius</i>	-	-
24.	7168	-	-	0,386	<i>insidiosus</i>	-	0,023
25.	7170	-	-	0,345	<i>nebraskensis</i>	-	-
26.	7172	-	-	-	-	-	-
27.	7173	-	-	-	-	-	-
28.	7174	-	-	0,444	<i>insidiosus</i>	-	0,027
29.	7175	-	-	-	-	-	-
30.	7176	-	-	-	-	-	-
31.	7177	-	-	0,281	<i>insidiosus</i>	-	0,136

5.3 Vyhodnocení testů patogenity vybraných kmenů *C. m. subsp. michiganensis* na rostlinách rajčete

Virulence vybraných kmenů *C. m. subsp. michiganensis* byla testována pomocí testů patogenity na rostlinách rajčete náchylné odrůdy Šejk. Testováno bylo celkem 11 kmenů, z toho kmen LMG 5727, který byl použit jako pozitivní kontrola byl testován celkem třikrát, ostatní kmeny každý jednou. Každý kmen byl otestován na 12 rostlinách rajčete. Hladina virulence byla zhodnocena pomocí čtyřbodové stupnice, vyšší číslo značí vyšší stupeň virulence kmene. V následujících tabulkách je uveden stupeň napadení jednotlivých rostlin po inokulaci vybranými kmeny patogena, koeficient napadení neboli průměrný stupeň napadení infikovaných rostlin každé varianty jednotlivým kmenem a jejich směrodatná odchylka.

Tabulka 4. Vyhodnocení testů patogenity na rostlinách rajčete

Tabulka 4/1 Vyhodnocení testů patogenity na rostlinách rajčete v 1. pokusu

Pořad. číslo	Číslo kmene	Počet rostlin												KN	Sm. odch.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1.	LMG 5727	3	2	1	3	3	2	2	3	4	2	3	3	2,583	0,792
2.	LMG 7333	3	4	2	3	3	3	2	3	2	3	2	1	2,583	0,792
3.	RICP 5065	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	3	3,750	0,452
4.	RICP 5074	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1,167	0,389

Tabulka 4/2 Vyhodnocení testů patogenity na rostlinách rajčete ve 2. pokusu

Pořad. číslo	Číslo kmene	Počet rostlin												KN	Sm. odch.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1.	LMG 5727	3	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1,583	0,668
2.	LMG 3685	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1,167	0,389
3.	RICP 218	2	4	1	4	3	3	2	1	1	1	1	2	2,083	1,164
4.	RICP 5068	1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	3	1	1,667	0,778

Tabulka 4/3 Vyhodnocení testů patogenity na rostlinách rajčete ve 3. pokusu

Pořad. číslo	Číslo kmene	Počet rostlin												KN	Sm. odch.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1.	LMG 5727	2	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1,667	0,651
2.	CRI 8050	1	3	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1,500	0,674
3.	CRI 8057	2	3	1	3	3	3	2	1	3	1	2	4	2,333	0,984
4.	CRI 8078	3	2	3	3	2	2	3	4	3	4	4	3	3,000	0,738
5.	CRI 8084	3	4	3	3	1	2	4	1	2	3	4	4	2,833	1,114

Vysvětlivky:

Ve sloupci počet rostlin značí každé z čísel 1-12 jednu rostlinu

Stupně vyhodnocení: 1 – zdravá rostlina bez příznaků, 2 – okrajové vadnutí listů (napadení do 30% rostliny), 3 – vadnutí do půlky čepele listů (napadení do 50% rostliny), 4 – vadnutí na více než polovině listu (napadení více než 50% rostliny).

KN – koeficient napadení daného kmene

Sm. odch. – směrodatná odchylka

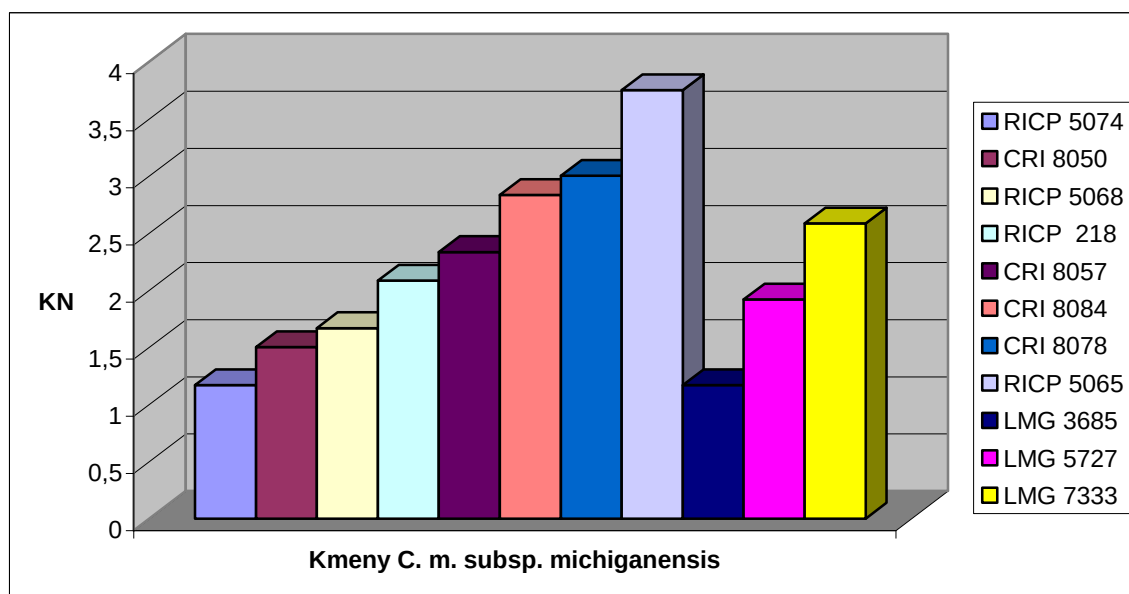
Údaje o virulenci v souvislosti s fluiditou jednotlivých testovaných kmenů jsou shrnuty v tabulce 5. Pro sbírkový kmen LMG 5727, který byl použit jako pozitivní kontrola, byl stanoven celkový koeficient napadení ze všech opakování. Testované kmeny jsou seřazeny vzestupně podle koeficientu napadení (KN).

Tabulka 5 Porovnání virulence a fluidity testovaných kmenů *C. m. subsp. michiganensis*

Pořadové číslo	Číslo kmene	Virulence (KN)	Fluidita
7.	RICP 5074	1,167	Nefluidní
2.	LMG 3685	1,167	Intermediální
8.	CRI 8050	1,500	Nefluidní
6.	RICP 5068	1,667	Intermediální
1.	LMG 5727	1,917	Fluidní
4.	RICP 218	2,083	Fluidní
9.	CRI 8057	2,333	Intermediální
3.	LMG 7333	2,583	Fluidní
11.	CRI 8084	2,833	Fluidní
10.	CRI 8078	3,000	Fluidní
5.	RICP 5065	3,750	Fluidní

V grafu 1 je pomocí stanovených koeficientů napadení porovnána virulence všech kmenů ověřovaných v testech patogenity, nejprve jsou uvedeny české kmeny a poté zahraniční. V obou skupinách jsou testované kmeny seřazeny vzestupně podle koeficientu napadení.

Graf 1 Porovnání virulence jednotlivých kmenů *C. m. subsp. michiganensis*



5.4 Statistické hodnocení výsledků získaných v testech patogenity

Pro další zhodnocení byla provedena analýza rozptylu jednoduchého třídění (ANOVA) s následným podrobnějším vyhodnocením pomocí Scheffé-ho metody. Pomocí této metody byla vyhodnocena průkaznost rozdílů ve virulenci jednotlivých testovaných kmenů *C. m. subsp. michiganensis*.

Byla stanovena nulová hypotéza, podle které se průměry virulence jednotlivých kmenů patogena významně neliší.

Tabulka 5 Výsledky F-testu analýzy rozptylu jednoduchého třídění

Variabilita mezi	Součet čtverců odchylek	Stupně volnosti	Rozptyl	F-test
průměry tříd	$S_1 = 87,69$	$f_1 = m-1 = 12$	$s_1^2 = 7,3075$	$F = s_1^2 : s_r^2 =$ 14,947
uvnitř tříd	$S_r = 69,92$	$f_r = m(n-1) = 143$	$s_r^2 = 0,4889$	
Celková	$S = 157,61$	$f = mn-1 = 155$		

Vysvětlivky:

$m = 13$ = počet tříd (testovaných kmenů), $n = 12$ = četnost třídy (počet opakování)

Vypočtené testové kritérium $F = 14,947$ a platí tedy že $F > F_{0,01}(12, 143) = 2,30$

Na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ (tj. pro $1 - \alpha = 0,99$) byla zamítnuta nulová hypotéza a přijata A hypotéza, podle které nejméně jedna dvojice průměrů vykazuje průkazný rozdíl ve virulenci.

Pomocí Scheffé-ho metody byla vypočtena minimální hodnota průkazné difference $d_{0,01 \min} = 1,499$.

V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty skutečných diferencí mezi koeficienty napadení stanovenými pro jednotlivé kmeny a označeny hodnoty difference u těch kmenů, jejichž koeficient napadení se průkazně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,01$.

Tabulka 6 Absolutní hodnoty skutečných diferencí d_{sk} mezi koeficienty napadení jednotlivých kmenů

	Kmen	RICP 5074	CRI 8050	LMG 5727	LMG 5727	RICP 5068	RICP 218	CRI 8057	LMG 5727	LMG 7333	CRI 8084	CRI 8078	RICP 5065
Kmen	KN	1,167	1,500	1,583	1,667	1,667	2,083	2,333	2,583	2,583	2,833	3,000	3,750
LMG 3685	1,167	0	0,333	0,416	0,500	0,500	0,916	1,166	1,416	1,416	1,666 xxx	1,833 xxx	2,583 xxx
RICP 5074	1,167	x	0,333	0,416	0,500	0,500	0,916	1,166	1,416	1,416	1,666 xxx	1,833 xxx	2,583 xxx
CRI 8050	1,500	x	x	0,083	0,167	0,167	0,583	0,833	1,083	1,083	1,333	1,500 xxx	2,250 xxx
LMG 5727	1,583	x	x	x	0,084	0,084	0,500	0,750	1,000	1,000	1,250	1,417	2,167 xxx
LMG 5727	1,667	x	x	x	x	0	0,416	0,666	0,916	0,916	1,166	1,333	2,083 xxx
RICP 5068	1,667	x	x	x	x	x	0,416	0,666	0,916	0,916	1,166	1,333	2,083 xxx
RICP 218	2,083	x	x	x	x	x	x	0,250	0,500	0,500	0,750	0,917	1,667 xxx
CRI 8057	2,333	x	x	x	x	x	x	x	0,250	0,250	0,500	0,667	1,417
LMG 5727	2,583	x	x	x	x	x	x	x	x	0	0,250	0,417	1,167
LMG 7333	2,583	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,250	0,417	1,167
CRI 8084	2,833	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,167	0,917
CRI 8078	3,000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0,750

Vysvětlivky:

V tabulce skutečných diferencí jsou tučným písmem a symbolem **xxx** označeny difference mezi koeficienty napadení těch kmenů, které se liší na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ a pro které platí $|d_{sk}| > d_{0,01 \min}$ vypočtená Scheffé-ho metodou, tedy $|d_{sk}| > 1,499$.

Z tabulky 6 vyplývá, že koeficient napadení neboli stupeň virulence dvanácti dvojic kmenů se průkazně lišil na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Nejvyšší stupeň virulence vykázal kmen RICP 5065. Koeficient napadení $KN = 3,750$ vypočtený pro tento kmen se průkazně lišil od koeficientů napadení sedmi dalších kmenů. Konkrétně to byly kmeny RICP 218 s $KN = 2,083$, LMG 5727 a RICP 5068 s $KN = 1,667$, LMG 5727 s $KN = 1,583$, CRI 8050 s $KN = 1,500$, RICP 5074 a LMG 3685 s $KN = 1,167$. Druhý nejvyšší stupeň virulence

vykázal kmen CRI 8078, jehož koeficient napadení byl $KN = 3,000$. Virulence tohoto kmenu byla průkazně vyšší než virulence kmenu CRI 8050 s $KN = 1,500$ a kmenů RICP 5074 a LMG 3685 s $KN = 1,167$. Vysoká hladina virulence byla prokázána také u kmenu CRI 8084, jehož koeficient napadení $KN = 2,833$ byl průkazně vyšší než koeficient napadení $KN = 1,167$ vypočtený pro kmeny RICP 5074 a LMG 3685.

Mezi kmeny s nejnižší hladinou virulence patřil kmen LMG 3685 ze zahraniční sbírky a kmen RICP 5074 z české sbírky. Koeficient napadení, vypočtený pro oba tyto kmeny byl shodný, a to $KN = 1,167$. Nízký stupeň virulence vykázal také kmen z české sbírky CRI 8050 s $KN = 1,500$. Naopak jako nejvirulentnější kmen v rámci těchto pokusů se projevil kmen RICP 5065 pocházející z české sbírky. Koeficient napadení vypočtený pro tento kmen byl $KN = 3,750$. Další dva kmeny vykazující vysokou hladinu virulence byly kmen CRI 8078 s $KN = 3,000$ a kmen CRI 8084 s $KN = 2,833$, oba kmeny pocházely z české sbírky. Kmeny RICP 5065, CRI 8078 a CRI 8084 vykazující nejvyšší hladinu virulence byly z hlediska morfologie fluidní, naopak kmeny LMG 3685, RICP 5074 a CRI 8050, které se projevíly jako nejméně virulentní, byly kmeny nefluidní a intermediální.

6 Diskuse

Včasná a především správná diagnóza choroby je základem pro úspěšnou ochranu proti bakteriálnímu vadnutí a rakovině rajčete způsobené karanténní bakterií *C. m. subsp. michiganensis*. Dle mezinárodních diagnostických protokolů vydaných EPPO je diagnostika založena na izolaci patogena z rostlinných pletiv na semiselektivním médiu a následné identifikaci podezřelých bakteriálních kolonií pomocí nejméně dvou různých identifikačních testů (EPPO/CABI, 2005). Různé diagnostické metody používané pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis* mají své výhody a nevýhody spojené s jejich citlivostí a časovou náročností a jsou také rozdílně spolehlivé. Aby nedocházelo k chybné diagnóze, která by mohla vést k neomezenému šíření patogena, měly by být pro jeho identifikaci používány co nejspolehlivější metody (León et al., 2006).

V této práci byla metabolická aktivita vybraných kmenů *C. m. subsp. michiganensis* testována pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria s využitím počítačového programu MicroLogTM2 a databáze pro grampozitivní bakterie. Testováno bylo 31 převážně fluidních kmenů pocházejících ze sbírky oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. – Praha. Všechny tyto kmeny byly v předchozím testování metodami IFA a PCR identifikovány jako *C. m. subsp. michiganensis*, jejich identita tedy byla prokázána. Podle identifikačních kritérií firmy Biolog Bacteria, dle kterých je organismus identifikován při $SIM \geq 0,500$ byl pouze jeden kmen z 31 testovaných identifikován jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tedy až na úroveň poddruhu. Dalších 10 kmenů bylo identifikováno jako *Clavibacter michiganensis*, tedy na úroveň druhu a 20 kmenů nebylo identifikováno. Pokud by za identifikované byly považovány i kmeny, u kterých hodnota indexu similarity $SIM \geq 0,100$, bylo by identifikováno alespoň na úroveň druhu 19 kmenů oproti 11 identifikovaným kmenům při $SIM \geq 0,500$. Při vyjádření v procentech by to bylo 61,3 % kmenů identifikovaných na úroveň druhu při $SIM \geq 0,100$ oproti pouhým 35,5 % kmenů identifikovaných na úroveň druhu při $SIM \geq 0,500$. Při dodržování kritérií stanovených výrobcem bylo však identifikováno jen 35,5 % na úroveň druhu s jednou výjimkou na úroveň poddruhu. Z výsledků těchto pokusů se tedy mikrobiální identifikační systém Biolog Bacteria jeví jako poměrně nespolehlivá metoda pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis*.

Kaneshiro et al. (2006) ověřovali spolehlivost monoklonální protilátky MAb Cmm1 pro odlišení *C. m. subsp. michiganensis* od saprofytických mikroorganismů. Identifikace patogena pomocí této protilátky byla porovnávána s identifikací pomocí metody Biolog Bacteria. Autoři ve své studii uvádějí, že metodou Biolog Bacteria byly identifikovány virulentní, hypovirulentní i avirulentní kmeny tohoto patogena, přičemž virulentní kmeny vykazovaly vyšší index podobnosti než kmeny hypovirulentní a avirulentní. Všechny kmeny však byly identifikovány spolehlivě pouze na úroveň druhu a v některých případech jen na úroveň rodu. Poddruhy identifikované touto metodou se lišily a dokonce i virulentní kmeny *C. m. subsp. michiganensis* byly chybně identifikovány jako *C. m. subsp. tessellarius*. Metoda Biolog Bacteria byla označena výše zmíněnými autory jako spolehlivá pouze pro identifikaci patogena na úroveň druhu a jako vhodnější způsoby pro identifikaci bakterie *C. m. subsp. michiganensis* uvedli metody IFA a nepřímá ELISA s využitím monoklonální protilátky MAb Cmm1.

Kokošková et al. (2005) zkoumali spolehlivost různých diagnostických metod pro identifikaci bakterie *C. m. subsp. sepedonicus*, která způsobuje bakteriální kroužkovitost bramboru. Tato bakterie je blízce příbuzná bakterii *C. m. subsp. michiganensis*, se kterou vykazuje mnoho shodných vlastností a stejně jako *C. m. subsp. michiganensis* vytváří více či méně fluidní bakteriální kolonie. Kokošková et al. (2005) stejně jako Kaneshiro et al. (2006) uvádějí, že všechny testované kmeny byly metodou Biolog Bacteria spolehlivě identifikovány pouze na úroveň druhu či rodu a v mnoha případech nebyly identifikovány vůbec. Výsledky výzkumu těchto autorů se shodují s výsledky této diplomové práce. Kokošková et al. (2005) dále uvádějí, že pomocí metody Biolog Bacteria byly fluidní kmeny identifikovány sice spolehlivěji než nefluidní, ale ani fluidní kmeny nebyly identifikovány uspokojivě. Metodu Biolog Bacteria autoři označili jako nedostatečně spolehlivou pro identifikaci bakterie *C. m. subsp. sepedonicus* a jako spolehlivější metody pro identifikaci tohoto patogena doporučili metody PCR, IFA a FAA.

Metoda PCR je založena na detekci *C. m. subsp. michiganensis* pomocí plazmidových markerů. Úspěšnost této metody tedy závisí na přítomnosti plazmidu nesoucího gen patogenity *pat-1*. V bakteriálních buňkách *C. m. subsp. michiganensis* však může dojít ke ztrátě tohoto plazmidu a tak tato metoda poskytuje někdy falešné negativní výsledky (Kaneshiro, Alvarez, 2001). Tuto informaci potvrdili i Bella et al. (2007), kteří analyzovali vzorky rostlinných pletiv skleníkových rajčat vykazujících symptomy typické pro bakteriální vadnutí a rakovinu rajčete. Kolonie grampozitivních bakterií morofologicky shodných s *C. m. subsp. michiganensis* byly izolovány z rostlinných pletiv a byly

podrobeny identifikaci metodou PCR s použitím specifických plazmidových primerů CMM5/CMM6. Přítomnost patogena však nebyla pomocí testů PCR prokázána, a to ani při analýze izolovaných bakteriálních kolonií, ani při přímé analýze napadených rostlinných pletiv. Izolované bakteriální kolonie tedy byly podrobeny dalším analýzám pomocí metody Biolog Bacteria a aglutinační metody se specifickou protilátkou. Obě tyto metody identifikovaly bakterie jako *C. m. subsp. michiganensis*. Identita patogena byla potvrzena i v testech patogenity na rostlinách rajčete, které 14 dní po inokulaci vykazovaly vadnutí a diskoloraci cévních svazků. Z toho bylo vyvozeno, že i v přírodní populaci se vyskytují virulentní kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, které neobsahují plazmid, na jehož přítomnosti je založena detekce pomocí metody PCR, a tudíž tato metoda není vždy spolehlivá. Systém Biolog Bacteria v tomto případě správně identifikoval patogena až na úroveň poddruhu a byl označen jako spolehlivá metoda pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis* na rozdíl od metody PCR, která poskytla chybné výsledky.

Bella et al. (2007) pro vyhodnocení zbarvení mikrodestiček použili přístrojovou čtečku speciálně vyrobenou pro tento identifikační systém a pro identifikaci patogena využili počítačový program MicroLogTM3, na rozdíl od pokusů v této diplomové práci, kde bylo zbarvení Biolog destiček vyhodnocováno pouhým okem a k identifikaci bylo využito programu MicroLogTM2. Vzhledem k možným nepřesnostem při vyhodnocování zbarvení mikrodestiček pouhým okem a k použití starší verze programu MicroLogTM by tyto rozdíly v provedení metody Biolog Bacteria mohly mít vliv na výsledky identifikačních testů.

Kokošková a Kúdela (2002) uvádějí, že fluidní kmeny *C. m. subsp. sepedonicus* vykazovaly vyšší metabolickou aktivitu než kmeny nefluidní a proto byly metodou Biolog Bacteria identifikovány častěji než kmeny nefluidní. Tato metoda se však neukázala jako dostatečně spolehlivá ani při identifikaci fluidních kmenů *C. m. subsp. sepedonicus*. Předpokládaná vyšší metabolická aktivita fluidních kmenů *C. m. subsp. michiganensis* v porovnání s nefluidními kmeny této bakterie měla být ověřována v této diplomové práci. Vybrané kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, které byly převážně fluidní, byly testovány pomocí identifikačního systému Biolog Bacteria. Vzhledem k tomu, že na úroveň poddruhu byl identifikován pouze jeden kmen a na úroveň druhu pouze 35,5 % kmenů, se tato metoda prokázala jako nespolehlivá pro identifikaci fluidních kmenů *C. m. subsp. michiganensis*, a nemělo tak smysl ověřovat kmeny nefluidní.

Kaneshiro et al. (2006) uvádějí pro metodu Biolog Bacteria stejnou průkaznost pro kmeny *C. m. subsp. michiganensis* tvořící typické fluidní bakteriální kolonie i pro kmeny,

které tvoří kolonie nefluidní. Stupeň identifikace uvádějí stejně jako výsledky této diplomové práce pouze na úroveň druhu.

Vzhledem k výsledkům testů prováděných pomocí metody Biolog Bacteria byla pro testy patogenity na rostlinách rajčete vybrána skupina dalších kmenů *C. m. subsp. michiganensis*. Tato skupina obsahovala 11 kmenů vyznačujících se rozdílnou morfologií bakteriálních kolonií. Z těchto 11 kmenů jich 5 vytvářelo typické fluidní mukózní kolonie, 3 byly intermediální neboli semifluidní a 2 byly nefluidní. Kmeny pocházely z české sbírky bakterií oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. – Praha (RICP – Research Institute of Crop Production; CRI – Crop Research Institute) a z belgické sbírky (BCCM/LMG – Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, Gent). Porovnáme-li virulenci českých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* s virulencí kmenů zahraničních dle vypočteného koeficientu napadení, můžeme říci, že v obou skupinách se vyskytovaly více i méně virulentní kmeny a z hlediska původu kmenů tedy nebyl pozorován významný rozdíl v jejich virulenci.

Arnold et al. (2007) se věnovali výzkumu vlivu stresových podmínek na virulenci patogenů a došli k závěru, že změny v genomu patogena zapříčiňující změny ve virulenci jsou způsobeny vystavením stresovým podmínkám, jako jsou například vysoké či nízké teploty a nedostatek živin. Tyto stresové podmínky, ve kterých je patogen nucen upravit svůj metabolismus, upřednostňující vlastní přežití před rozmnožováním, mohou aktivovat změny v genomu patogena vedoucí ke zvýšení virulence. Oproti přirozenému prostředí, ve kterém je patogen vystaven vlivu všech těchto stresových faktorů by tedy při jeho dlouhodobém uchovávání v umělých podmínkách mohlo docházet ke snížení jeho virulence.

V této práci byly testovány kmeny *C. m. subsp. michiganensis* různého stáří, tedy uchovávané různě dlouhou dobu v laboratorních podmínkách. Zahraniční kmeny LMG a české kmeny RICP byly uchovávány ve sbírkách delší dobu než české kmeny CRI. Porovnáme-li virulenci kmenů z hlediska délky doby jejich uchovávání, pozorujeme, že i dlouhou dobu uchovávané kmeny, a to jak české tak i zahraniční, se projeví jako vysoce virulentní. U mladších kmenů CRI byl pozorován jak nižší tak vyšší stupeň virulence. Nelze tedy tvrdit, že starší kmeny z hlediska doby jejich uchovávání ve sbírkách by vykazovaly sníženou virulenci.

Hlavním předmětem této části výzkumu v této práci bylo zjištění rozdílů ve stupni virulence mezi fluidními a nefluidními kmeny *C. m. subsp. michiganensis*. Pomocí testů patogenity na náchylné odrůdě rajčete Šejk mělo být zjištěno, zda morfologie bakteriálních

kolonií různých kmenů tohoto patogena ovlivňuje stupeň jejich virulence. Kokošková et al. (2005) zjistili vliv morfologie bakteriálních kolonií *C. m. subsp. sepedonicus* na jejich virulenci pomocí testů patogenity na rostlinách bramboru. Uvádějí, že fluidní kmeny tohoto patogena vyvolávaly po inokulaci rostlin typické symptomy pro bakteriální kroužkovitost bramboru, zatímco po inokulaci nefluidními a intermediálními kmeny byly na bramboru častěji pozorovány atypické nebo nebyly pozorovány žádné symptomy této choroby. Rostliny inokulované fluidními kmeny navíc vykazovaly příznaky choroby dříve a s větší intenzitou než rostliny inokulované nefluidními kmeny. Fluidnější kmeny se tedy projevovaly jako více virulentní. Toto tvrzení však neplatilo pro všechny testované kmeny a nelze s jistotou říci, že virulence bakterie *C. m. subsp. sepedonicus* je ovlivněna fluiditou jejich bakteriálních kolonií. Tvrzení, že existuje vztah mezi morfologií bakteriálních kolonií a virulencí bakteriálních kmenů *C. m. subsp. sepedonicus* popřeli i autoři Westra a Slack (1992).

Podle výsledků této práce se nefluidní kmeny *C. m. subsp. michiganensis* projeví jako méně virulentní ve srovnání s kmeny fluidními, které vykazovaly vysoký stupeň virulence. Fluidní kmeny se vyznačují vyšší produkcí exopolysacharidů a teoreticky vyšší metabolickou aktivitou. Předpoklad, že tyto kmeny by mohly vykazovat i vyšší stupeň virulence ve srovnání s nefluidními kmeny, byl tedy s ohledem na výsledky této práce potvrzen. V rozporu s těmito výsledky Kaneshiro et al. (2006) uvádějí, že i kmeny *C. m. subsp. michiganensis* vyznačující se nefluidními bakteriálními koloniemi způsobovaly typické příznaky pro bakteriální vadnutí rajčete.

Fluidita bakteriálních kolonií je ovlivněna produkcí exopolysacharidů (EPS) bakteriálními buňkami a jejich chemickým složením. Jahr et al. (1999) uvádějí, že EPS plní mnoho významných funkcí pro vývoj bakteriální buňky a jejich produkce je předpokladem pro úspěšnou infekci rostliny rajčete a rozvoj choroby. Bermpohl et al. (1996) ve své studii prokázali, že různé složení EPS je spojeno se schopností kolonizovat rostlinná pletiva a hraje roli při rozpoznání bakterií rostlinou v raných stádiích infekce. Tito autoři rozdělili kmeny *C. m. subsp. michiganensis* do dvou skupin na základě rozdílného chemického složení EPS. Do první skupiny zahrnuli kmeny tvořící fluidní bakteriální kolonie s typickým složením EPS, které byly schopny kolonizovat cévní svazky rajčat a do druhé skupiny zařadili nefluidní kmeny, tedy kmeny s atypickým složením EPS, které nebyly schopny úspěšné kolonizace rostlinných pletiv. Z toho vyplývá, že některé nefluidní kmeny vyznačující se produkcí EPS s atypickým chemickým složením nejsou schopny úspěšně kolonizovat rostlinná pletiva a jsou tedy avirulentní.

Gartemann et al. (2003) však ze svého výzkumu vyvodili, že produkce EPS není hlavním faktorem virulence bakterie *C. m. subsp. michiganensis*.

Virulence tohoto patogena je kromě produkce EPS ovlivněna i dalšími faktory, především produkcí extracelulárních enzymů. Produkce těchto enzymů je kódována geny lokalizovanými v plazmidech bakteriální buňky. Vzhledem k možné ztrátě těchto plazmidů v bakteriální buňce tak může dojít i ke snížení či ztrátě virulence (Jahr et al., 2000). Kaneshiro et al. (2006) uvádějí také závislost odrůdy rajčete na projevu virulence různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis*. Na stupni virulence této bakterie se tedy podílí mnoho různých faktorů. Působení těchto faktorů v jejich různých kombinacích tak může způsobovat různé výsledky v testech patogenity na rostlinách rajčete. Tímto by mohl být vysvětlen rozdíl v závěrech výzkumu autorů Kaneshiro et al. (2006) a závěrech vyvozených z výzkumu prováděného v rámci této diplomové práce. V testech patogenity prováděných v rámci této práce se fluidní kmeny projeví jako virulentnější než kmeny intermediální a nefluidní. Z těchto výsledků by tak bylo možno vyvodit, že virulence bakterie *C. m. subsp. michiganensis* je ovlivněna její morfologií. Vzhledem k odlišným výsledkům jiných autorů však nelze s jistotou prokázat platnost tohoto tvrzení.

Morfologie bakteriálních kolonií *C. m. subsp. michiganensis* je pravděpodobně jedním z faktorů, které ovlivňují stupeň virulence tohoto patogena. Celkový projev virulence této bakterie je však ovlivněn mnoha dalšími faktory a nelze vždy jednoznačně tvrdit, že fluidní kmeny jsou virulentnější než kmeny nefluidní. K jednoznačnějšímu závěru by bylo možné dospět po ověření většího počtu kmenů *C. m. subsp. michiganensis* s rozdílnou morfologií, poněvadž soubor s větší množinou prvků by mohl podat spolehlivější výsledky. Do testů patogenity by například bylo také možné zahrnout i další odrůdy rajčete a v následujících pokusech by kromě morfologie bakteriálních kolonií patogena také mohly být zohledněny některé další faktory ovlivňující projev virulence tohoto patogena.

7 Závěr

Tato diplomová práce si kladla za cíl ověřit, zda morfologická variabilita různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* má vliv na jejich metabolickou aktivitu a virulenci.

Pro posouzení metabolické aktivity byly morfologicky odlišné kmeny tohoto patogena podrobeny testování mikrobiálním identifikačním systémem Biolog Bacteria, který rozlišuje bakterie na základě toho, jak využívají různé zdroje uhlíku. Identita všech vybraných kmenů byla prokázána v předchozích diagnostických testech metodami IFA a PCR. V souladu s identifikačními kritérii programu MicroLogTM2 verze 4.01B firmy Biolog Bacteria byl z celkového počtu 31 převážně fluidních kmenů identifikován pouze 1 kmen jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tedy až na úroveň poddruhu. Dalších 10 kmenů bylo identifikováno jako *Clavibacter michiganensis*, tedy pouze na úroveň druhu a 20 kmenů nebylo identifikováno vůbec. Při vyjádření v procentech to bylo pouze 35,5 % kmenů identifikovaných alespoň na úroveň druhu. Mikrobiální identifikační systém Biolog Bacteria byl z důvodu takto nízké procentuality identifikovaných kmenů shledán jako nedostatečně spolehlivý pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis*. Vzhledem k podobným závěrům dalších autorů by identifikace tohoto patogena měla být založena na spolehlivějších metodách jako například IFA nebo ELISA.

Druh *Clavibacter michiganensis* je rozdělen do pěti poddruhů podle jejich typických hostitelů. Každý poddruh tohoto patogena je úzce specializován na kolonizaci pletiv určitého rostlinného druhu. Poddruh *C. m. subsp. michiganensis* je jako jediný z výše zmíněných pěti poddruhů specializován na kolonizaci cévních svazků rajčete. Na rostlinách rajčete se tedy nemůže vyskytovat žádný jiný poddruh tohoto bakteriálního druhu. Z toho vyplývá, že výsledky získané metodou Biolog Bacteria jsou postačující i přes to, že dokáže spolehlivě identifikovat patogena pouze na úroveň druhu. Tato metoda tedy může být v běžné rostlinolékařské praxi používána pro identifikaci *C. m. subsp. michiganensis* v kombinaci s dalšími diagnostickými metodami.

S ohledem na výsledky předchozího výzkumu byla u fluidních kmenů předpokládána vyšší úroveň metabolické aktivity než u kmenů nefluidních a intermediálních. Vzhledem k tomu, že mikrobiální identifikační systém Biolog Bacteria neumožnil spolehlivou identifikaci ani fluidních kmenů, nemělo smysl testovat touto metodou kmeny nefluidní, které vykazují většinou nižší metabolickou aktivitu než kmeny fluidní.

Pro ověření vlivu morfologické variability různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* na jejich virulenci byly provedeny testy patogenity na rostlinách rajčete. Vyšší stupeň napadení vykazovaly rostliny inokulované fluidními kmeny *C. m. subsp. michiganensis*, naopak kmeny nefluidní a intermediální se projevíly jako méně virulentní. Z 11 testovaných kmenů 4 nejvíce virulentní kmeny byly fluidní a 4 nejméně virulentní kmeny byly nefluidní a intermediální. Mezi hladinami virulence nejvíce a nejméně virulentních kmenů byl shledán signifikantní rozdíl. Z hlediska morfologie se tedy kmeny tvořící typické fluidní bakteriální kolonie projevíly jako virulentnější než kmeny, jejichž bakteriální kolonie byly nefluidní a intermediální. Z toho bylo vyvozeno, že morfologie různých kmenů *C. m. subsp. michiganensis* má vliv na jejich virulenci. Přesněji řečeno, morfologie je jedním z faktorů podílejících se na projevu virulence tohoto patogena. Jeho celková hladina virulence je totiž podmíněna mnoha dalšími faktory, které mohou mít vliv na výsledky pokusů. Pro potvrzení závěru vyvozeného z výsledků této práce by bylo zapotřebí ověřit větší počet kmenů *C. m. subsp. michiganensis* s rozdílnou morfologií, poněvadž soubor s větší množinou prvků by mohl podat spolehlivější výsledky a do testů patogenity by bylo vhodné zařadit například i další odrůdy rajčete či zohlednit jiné faktory ovlivňující virulenci tohoto patogena.

Výsledky pokusů byly posouzeny také z hlediska vlivu různého původu kmenů a z hlediska vlivu jejich stáří neboli délky doby jejich uchovávání v bakteriologických sbírkách na jejich virulenci. V testech patogenity vykazovaly kmeny pocházející ze zahraniční sbírky i z českých sbírek různou virulenci. Porovnáním virulence českých a zahraničních kmenů bylo zjištěno, že původ kmenů neměl vliv na hladinu jejich virulence. Stejně tak nebyl prokázán významný vliv délky uchovávání kmenů patogena v bakteriologických sbírkách na stupeň jejich virulence.

8 Seznam použité literatury

- ALVAREZ, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 42, 339-366.
- AMARA, M.A.; RABLE, K.A. ; TALKRAN, F.N. 1996. Activity of *Pseudomonas fluorescens* mutants in relation to growth regulators production and biological control in tomato plants. *Annals of Agricultural Science* 41, 111-124.
- ARNOLD, Dawn L.; JACKSON, Robert W.; WATERFIELD, Nick R.; MANSFIELD, John W. 2007. Evolution of microbial virulence: the benefit of stress. *Trends in Genetics* 23 (6), 293-300.
- BASIM, Esin; BASIM, Huseyin; MUSA, Özcan. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* 77, 992-996.
- BELLA, P.; IALACCI, G.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, V. 2007. Detection of atypical strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomatoes in Sicily. XIV Congresso S.I.Pa.V., Perugia 18 – 21 settembre 2007.
- BELLI, Giuseppe. 2007. Elementi di patologia vegetale. 1. vydání. Padova: Piccin, 407 s. – ISBN 88-299-1837-7
- BERMPOHL, A.; DREIER, J.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R. 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiological Research* 151, 391-399.
- BOLKAN, H.A.; REINERT, W.R. 1994. Developing and implementing IPM strategies to assist farmers: an industry approach. *Plant Disease* 78, 545-550.
- BURGER, Annette; GRAFEN, Ines; ENGEMANN, Jutta; NIERMANN, Erik; PIEPER, Martina; KIRCHNER, Oliver; GARTEMANN, Karl-Heinz; EICHENLAUB, Rudolf. 2005. Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiological Research* 160, 417-427.
- BURGER, A.; EICHENLAUB, R. 2003. Genetics of phytopathogenic bacteria. *Progress in Botany* 64, 98-114.
- CALZOLARI, Alessandra. 1986. Le malattie batteriche del pomodoro: sintomi, epidemiologia, diagnosi, lotta. *Informatore fitopatologico* 5, 11-17.
- CARIDDI, Corrado. 1997. Gravi infezioni di *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* su pomodoro in Puglia e Basilicata. *Informatore Fitopatologico* 12, 42-46.

COUNCIL DIRECTIVE 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the community. Office for Official Publications of the European Communities. Consolidated Text, 1-139.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection 22, 39–44.

DREIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85, 462-468.

DREIER, J.; MELETZUS, D.; EICHENLAUB, R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions 10, 195-206.

EPPO/CABI. 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin 35, 275-283.

EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2008-09). European and Mediterranean Plant Protection Organization, updated October 28, 2008 by webmaster [cit. 2009-03-06].

Dostupné z:

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf

EUROPEAN UNION. 1995. Commission directive 95/4/EC amendment of 21 Feb 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). Official Journal of the European Communities 44, 56-60.

FATMI, M.; SCHAAD, N.V. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. Phytopathology 78, 121-126.

FATMI, M.; SCHAAD, N.V. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. Plant Pathology 51, 149-154.

GARTEMANN, Karl H.; KIRCHNER, Oliver; ENGEMANN, Jutta; GRAFEN, Ines; EICHENLAUB, Rudolf; BURGER, Annette. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology 106, 179–191

GITAITIS, R.D. 1990. Induction of a hypersensitivelike reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Disease 74, 58-60.

GITAITIS, R.D.; BEAVER, R.W.; VOLOUDAKIS, A.E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Disease 75, 834-838.

GLEASON, Mark L.; GITAITIS, Ron D.; RICKER, Mark D. 1993. Recent Progress in understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America. *Plant Disease* 77 (11), 1069-1076.

HAUSBECK, M.K.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C.M.; PODOLSKY, R.; FULBRIGHT, D.W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90, 38–44.

HAZZARD, Ruth V.; WICK, Robert L. ; DICKLOW, Bess M. Tomato Clavibacter Canker [online]. 01.06.2006. [cit. 2008-12-14].

Dostupné z:

http://www.umassvegetable.org/soil_crop_pest_mgt/disease_mgt/tomato_clavibacter_canker.html

HOGENHOUT, Saskia; LORIA, Rosemary. 2008. Virulence mechanism of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 449-456.

CHAMOT, J.; FULBRIGHT, D. W. 1988. Plasmid analysis of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Abstr.). *Phytopathology* 78, 1565.

CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease* 76, 1150-1154.

ISHI Manual of seed health testing methods. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) [online]. 2005. [cit. 2009-03-01]. Dostupné z: <http://www.worldseed.org/pdf/tomato%20Cmm.pdf>.

JAHR, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R. 2000. The endo- β -1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 703-714.

JAHR, Holger; BAHRO, Rainer; BURGER, Annette; AHLEMEZER, Jutta; EICHENLAUB, Rudolf. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* 1 (2), 113-118.

KANESHIRO, W.S.; ALVAREZ, A.M. 2001. Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 91, 46.

KANESHIRO, Wendy; MIZUMOTO, Carla; ALVAREZ, Anne. 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology* 116, 45-56.

KLEITMAN, Frida; BARASH, Isaac; BURGER, Annette. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. European Journal of Plant Pathology 121, 463-475.

KOKOŠKOVÁ, Blanka; KŮDELA, Václav. 2002. Induction of nonmucoid variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and comparison of their immunochemical and biochemical characteristics. Journal of Plant Diseases and Protection 109, 630-638.

KOKOŠKOVÁ, B.; MRÁZ, I.; JANSE, J.D.; FOUSEK, J.; JEŘÁBKOVÁ, R. 2005. Reliability of diagnostic techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Journal of Plant Diseases and Protection 112, 1-16.

KOKOŠKOVÁ, B.; VOKÁLKOVÁ, M.; PAVELA, R.; RYŠÁNEK, P. 2007. Účinnost rostlinných esenciálních olejů proti *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, původci bakteriálního vadnutí rajčete, *in vitro*. 12 stránek (CD) In: Sborník ze semináře „Šetrné zemědělství“, Křtiny v Moravském krasu, 17. 9. 2007.

KOKOŠKOVÁ, Blanka. 2008. Bakteriální choroby plodové zeleniny II. Zelinářství 11, 20-21.

KŮDELA, Václav; NOVACKY, Anton; FUCIKOVSKY, Leopold. 2002. Rostlinolékařská bakteriologie. 1. vydání. Praha: Academia. 347 s. – ISBN 80-200-0899-3

LEÓN, L.; SIVERIO, F.; RODRIGUEZ, A. 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. Journal of Microbiological Methods 67, 141-149.

LEÓN, L.; SIVERIO, F.; LOPÉZ, M.; RODRIGUEZ, A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. Crop Protection 27, 1277-1283.

MARCUCCI, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 26, 83-89.

MELETZUS, D.; BERMPOHL, A.; DREIER, J.; EICHENLAUB, R. 1993. Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology 175, 2131-2136.

MODAK, B.; TORRES, R.; WILKENS, M.; URZÚA, A. 2004. Antibacterial activity of compounds isolated of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum* on phytopathogenic bacteria. Journal of the Chilean Chemical Society 49, 1-3.

NINOT, A.; ALETA, N.; MORAGREGA, C.; MONTESINOS, E. 2002. Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. Plant Disease 86, 583-587.

POUVOVÁ, D.; KOKOŠKOVÁ, B.; PAVELA, R.; RYŠÁNEK, P. 2008. Ověření biologické účinnosti esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* proti *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis*. In: Sborník příspěvků z třetího ročníku konference doktorandů oboru ochrana rostlin 2008: 49-59.

PROKINOVÁ, Evženie. Seed health as dominant attribute of seed quality [online]. 14.2.2001. [cit. 2008-12-14].

Dostupné z: <http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=109966&iSub=566>

RŮŽIČKA, Tomáš. Zpráva o výskytu škodlivých organismů a poruch č. 14 za období 16.7. – 29.7. 2007 [online]. 30.7.2007. [cit. 2008-12-14].

Dostupné z:

http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive_organismy/monitoring_so_na_uzemi_cr/monitorovaci_zpravy_o_vyskytu_so/2007/monitoring_SO_a_poruch_14_2007.htm

RŮŽIČKA, Tomáš. Zpráva o výskytu škodlivých organismů a poruch č. 19 za období 29.9. – 31.10. 2008 [online]. 4.11.2008. [cit. 2008-12-14].

Dostupné z:

http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive_organismy/monitoring_so_na_uzemi_cr/monitorovaci_zpravy_o_vyskytu_so/2008/monitoring_SO_a_poruch_19_2008.htm

SAHIN, F.; USLU, H. ; KOTAN, R. ; DONMEZ, M. F. 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. Plant Pathology 51, 399.

SCORTICHINI, M.; STRAVATO, V.M. 1989. Importanza della batteriosi del pomodoro nel Lazio. L'informatore Agrario 19, 49-54.

STAMOVA, L.; SOTIROVA, V. 1987. Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 23, 211-216.

THEODORO, G.; MARINGONI, A. C. 2000. *In vitro* and *in vivo* action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent of the bacterial canker of tomato. Scientia Agricola 57, 439-443

THYR, B.D.; WEBB, R.E.; JAWORSKI, C.A.; RATCLIFFE, T.J. 1973. Tomato bacterial canker: control by seed treatment. Plant Disease Reporter 57, 974-977.

UMESHA, S. 2006. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. Crop Protection 25, 375-381.

UMESHA, S.; RICHARDSON, P.A. ; KONG, P. ; HONG, C.X. 2008. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods 72, 95-97.

VONDRÁŠKOVÁ, Šárka. Bakteriální vadnutí rajčete znovu objeveno ve Velké Británii [online]. 12.12.2008. [cit. 2008-12-14].

Dostupné z:

<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=86809&ids=0&cmo=11&cye=2008>

WESTRA, A.A.G.; SLACK, S.A. 1992. Isolation and characterisation of extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 82, 1193-1199.

YOGEV, Anat; RAVIV, Michael; KRITZMAN, Giora; HADAR, Yitzhak; COHEN, Ron; KIRSHNER, Benny; KATAN, Jaacov. 2009. Suppression of bacterial canker of tomato by composts. Crop Protection 28, 97-103

ZANÓN, María Jesús; JORDÁ, Concepción. 2008. Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh debris into soil: Preliminary evaluations under controlled conditions. Crop Protection 27, 1511-1518.

Přílohy

8.1 Tabulky

Tabulka 7 Vzorový metabolický profil bakterie *C. m. subsp. michiganensis* navržený firmou Bilog Bacteria

CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE

GP-ROD CAT+

End-Point

Progressive

Percent of Times Wells Are Positive At End-Point

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	79	0	0	2	0	0	0	0	27
B	48	0	31	77	98	0	90	0	65	8	100	0
C	31	27	67	15	98	100	0	4	0	10	8	0
D	6	0	62	98	23	0	0	19	0	54	15	100
E	0	35	88	0	65	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	19	60	2	0	0	0	0	0
G	17	4	67	81	52	60	0	0	77	0	0	92
H	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka 8 Příklad identifikace kmene 7011 identifikovaného na úroveň poddruhu *C. m.* subsp. *michiganensis* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Program : Biolog MicroLog2 4.01B

Read Time : Apr 25 2008 2:41 PM
 Incubation Time : 16-24
 Sample Number : 3
 Plate Type : GP2
 Strain Type : GP-ROD CAT+
 Strain Number : 7011
 Strain Name : *Clavibacter michiganensis michiganensis*
 Other :
 Data Generation Mode : Manual
 Number +/- Reactions : 24 / 25 / 47
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:_BIOLO~1\GP401.KIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	<+>	-	-	-	<+>-	<+>-	{/}	-	-
B	{/}	-	{/}	<+>	<+>	-	<+>	-	{/}	<+>-	<+>	-
C	{/}	<+>	<+>	{/}	<+>	<+>	-	-	-	-	-	-
D	-	-	<+>	<+>	{/}	-	{/}	{/}	-	{/}	-	<+>
E	-	{/}	{/}	-	<+>	-	{/}	<+>-	-	-	-	-
F	-	{/}	{/}	-	<+>	<+>	{/}	-	<+>-	-	<+>-	-
G	{/}	-	{/}	{/}	<+>	<+>	{/}	-	<+>	-	-	{/}
H	{/}	-	-	-	-	-	-	-	{/}	-	{/}	{/}

=> Species ID : CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE	89	0.532	6.20	GP-ROD CAT+
2)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS NEBRASKENSE	6	0.035	7.10	GP-ROD CAT+
3)	ARTHROBACTER ILICIS	4	0.023	7.24	GP-ROD CAT+
4)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS	1	0.004	7.84	GP-ROD CAT+
5)	RATHAYIBACTER TRITICI	0	0.000	9.00	GP-ROD CAT+
6)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS INSIDIOSUM	0	0.000	9.00	GP-ROD CAT+
7)	MICROBACTERIUM SPP. (CDC.A-4)	0	0.000	9.42	GP-ROD
8)	CORYNEBACTERIUM AQUATICUM (AUREOBACTERIUM)	0	0.000	9.52	GP-ROD CAT+
9)	AUREOBACTERIUM TESTACEUM	0	0.000	9.53	GP-ROD CAT+
10)	ARTHROBACTER WOLUWENSIS	0	0.000	10.23	GP-ROD CAT+
Other)					

Tabulka 9 Příklad identifikace kmene 7010 identifikovaného na úroveň druhu *C. michiganensis* a poddruhu *C. m. subsp. tessellarius* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Program : Biolog MicroLog2 4.01B

Read Time : Apr 25 2008 2:32 PM
 Incubation Time : 16-24
 Sample Number : 2
 Plate Type : GP2
 Strain Type : GP-ROD CAT+
 Strain Number : 7010
 Strain Name : Calvibacter michiganensis michiganensis
 Other :
 Data Generation Mode : Manual
 Number +/- Reactions : 18 / 22 / 56
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:_BIOLO~1\GP401.KIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	<+>	-	-	-	{/}	{/}	-	-	{/}
B	{/}	-	{/}	<+>	<+>	-	<+>	-	<+>	<+>-	<+>	-
C	<+>	<+>	<+>	{/}	<+>	<+>	-	-	-	{/}	-	-
D	{/}	-	<+>	<+>	{/}	-	{/}	<+>	-	{/}	-	<+>
E	-	{/}	<+>	-	{/}	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	{/}	<+>	-	-	{/}	-	-	-
G	{/}	-	-	-	-	{/}	-	-	{/}	-	-	{/}
H	{/}	-	-	{/}	-	-	-	-	-	-	-	{/}

=> Species ID : CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS	93	0.862	1.09	GP-ROD CAT+
2)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS NEBRASKENSE	6	0.048	2.04	GP-ROD CAT+
3)	CURTOBACTERIUM ALBIDUM	1	0.010	2.58	GP-ROD CAT+
4)	CURTOBACTERIUM CITREUM	0	0.001	3.28	GP-ROD CAT+
5)	CORYNEBACTERIUM AQUATICUM (AUREOBACTERIUM)	0	0.000	3.66	GP-ROD CAT+
6)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE	0	0.000	4.45	GP-ROD CAT+
7)	CURTOBACTERIUM PUSILLUM	0	0.000	4.55	GP-ROD CAT+
8)	CURTOBACTERIUM LUTEUM	0	0.000	4.88	GP-ROD CAT+
9)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS INSIDIOSUM	0	0.000	5.81	GP-ROD CAT+
10)	JONESIA DENITRIFICANS	0	0.000	5.90	GP-ROD CAT+
Other)					

Tabulka 10 Příklad identifikace kmene 7033 identifikovaného na úroveň druhu *C. michiganensis* a poddruhu *C. m. subsp. nebraskensis* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Program	: Biolog MicroLog2 4.01B											
Read Time	: Apr 18 2008 4:43 PM											
Incubation Time	: 16-24											
Sample Number	: 3											
Plate Type	: GP2											
Strain Type	: GP-ROD CAT+											
Strain Number	: 7033											
Strain Name	: <i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>											
Other	:											
Data Generation Mode	: Manual											
Number +/- Reactions	: 15 / 25 / 56											
Database To Search	: MicroLog											
Data Base(s) Searched	: C:_BIOLO~1\GP401.KIC											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	<+>	-	-	-	{/}	{/}	-	-	{/}
B	{/}	-	{/}	<+>	<+>	-	<+>	-	-	<+>	<+>	-
C	<+>-	{/}	<+>	{/}	<+>	<+>	-	-	-	{/}	-	-
D	{/}	-	-	<+>	{/}	-	{/}	{/}	-	{/}	-	{/}
E	-	{/}	{/}	-	<+>	{/}	-	-	{/}	-	-	-
F	-	-	-	-	-	<+>	-	-	{/}	-	-	-
G	<+>	{/}	{/}	-	-	-	-	-	{/}	-	-	{/}
H	<+>	{/}	-	{/}	-	-	-	-	-	-	-	-
=> Species ID : CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS NEBRASKENSE <=												
	Species	PROB		SIM		DIST		TYPE				
=>1)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS NEBRASKENSE	99		0.878		1.69		GP-ROD CAT+				
2)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS	0		0.004		3.51		GP-ROD CAT+				
3)	CURTOBACTERIUM CITREUM	0		0.002		3.75		GP-ROD CAT+				
4)	CORYNEBACTERIUM AQUATICUM (AUREOBACTERIUM)	0		0.001		3.84		GP-ROD CAT+				
5)	AUREOBACTERIUM FLAVESCENS	0		0.000		4.52		GP-ROD CAT+				
6)	CURTOBACTERIUM ALBIDUM	0		0.000		5.15		GP-ROD CAT+				
7)	SANGUIBACTER INULINUS	0		0.000		5.70		GP-ROD CAT+				
8)	CURTOBACTERIUM LUTEUM	0		0.000		5.79		GP-ROD CAT+				
9)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS INSIDIOSUM	0		0.000		5.94		GP-ROD CAT+				
10)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE	0		0.000		6.05		GP-ROD CAT+				
Other)												

Tabulka 11 Příklad identifikace kmene 7174 identifikovaného na úroveň druhu *C. michiganensis* a poddruhu *C. m. subsp. insidiosus* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Program		: Biolog MicroLog2 4.01B										
Read Time		: Mar 04 2008 3:45 PM										
Incubation Time		: 16-24										
Sample Number		: 5										
Plate Type		: GP2										
Strain Type		: GP-ROD CAT+										
Strain Number		: CRI 7174										
Strain Name		: <i>Clavibacter michiganensis</i>										
Other		: rajče										
Data Generation Mode		: Manual										
Number +/- Reactions		: 9 / 17 / 70										
Database To Search		: MicroLog										
Data Base(s) Searched		: C:_BIOLO~1\GP401.KIC										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	{/}	-	-	-	-	-	-	-	{/}
B	{/}	-	{/}	<+>	<+>	-	{/}	-	-	{/}	<+>	-
C	{/}	{/}	<+>	{/}	<+>	<+>	-	-	-	{/}	-	-
D	-	-	-	{/}	-	-	{/}	{/}	-	<+>	-	<+>
E	-	{/}	{/}	-	{/}	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<+>
H	{/}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
=> Genus ID : CLAVIBACTER <=												
	Species								PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS INSIDIOSUM								---	0.444	0.23	GP-ROD CAT+
2)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS NEBRASKENSE								---	0.273	0.39	GP-ROD CAT+
3)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS								---	0.222	0.46	GP-ROD CAT+
4)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE								---	0.027	1.16	GP-ROD CAT+
5)	CURTOBACTERIUM CITREUM								---	0.008	1.55	GP-ROD CAT+
6)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS SEPEDONICUM								---	0.000	2.64	GP-ROD CAT+
7)	AUREOBACTERIUM FLAVESCENS								---	0.000	2.65	GP-ROD CAT+
8)	RATHAYIBACTER TRITICI								---	0.000	3.05	GP-ROD CAT+
9)	CORYNEBACTERIUM AQUATICUM (AUREOBACTERIUM)								---	0.000	3.07	GP-ROD CAT+
10)	CORYNEBACTERIUM MASTITIDIS								---	0.000	3.32	GP-ROD CAT+
Other)												

Tabulka 12 Příklad identifikace kmene 7007 neidentifikovaného ani na úroveň druhu *C. michiganensis* pomocí mikrobiálního identifikačního systému Biolog Bacteria

Program : Biolog MicroLog2 4.01B

Read Time : Apr 11 2008 3:14 PM
 Incubation Time : 16-24
 Sample Number : 3
 Plate Type : GP2
 Strain Type : GP-ROD CAT+
 Strain Number : 7007
 Strain Name : *Clavibacter michiganensis michiganensis*
 Other :
 Data Generation Mode : Manual
 Number +/- Reactions : 27 / 22 / 47
 Database To Search : MicroLog
 Data Base(s) Searched : C:_BIOLO~1\GP401.KIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	<+>	-	-	-	{}	{}	{}	-	{}
B	{}	<+>-	<+>	<+>	<+>	-	<+>	-	<+>	<+>	<+>	-
C	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	{}	{}	-	-
D	{}	-	<+>	<+>	{}	-	-	<+>	-	{}	{}	<+>
E	-	<+>-	<+>	<+>	<+>	-	-	-	{}	-	-	-
F	-	-	-	-	-	<+>	-	-	{}	-	-	-
G	{}	-	{}	{}	-	{}	-	-	{}	-	-	<+>
H	{}	{}	-	{}	-	-	-	-	-	{}	-	-

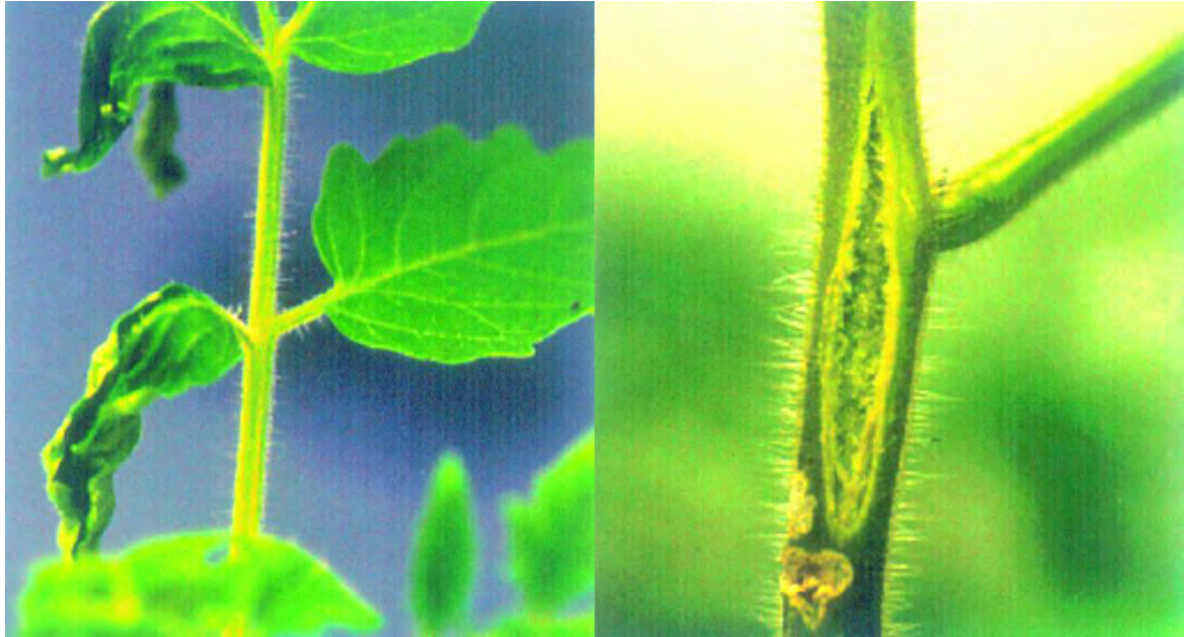
=> Species ID : CURTOBACTERIUM ALBIDUM <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	CURTOBACTERIUM ALBIDUM	87	0.734	2.39	GP-ROD CAT+
2)	CURTOBACTERIUM CITREUM	11	0.084	3.11	GP-ROD CAT+
3)	CURTOBACTERIUM PUSILLUM	2	0.016	3.66	GP-ROD CAT+
4)	CURTOBACTERIUM LUTEUM	0	0.000	6.23	GP-ROD CAT+
5)	CURTOBACTERIUM FLACCUMFACIENS	0	0.000	6.60	GP-ROD CAT+
6)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS TESSELLARIUS	0	0.000	7.11	GP-ROD CAT+
7)	CLAVIBACTER MICHIGANENSE SS MICHIGANENSE	0	0.000	7.50	GP-ROD CAT+
8)	JONESIA DENITRIFICANS	0	0.000	7.72	GP-ROD CAT+
9)	CORYNEBACTERIUM AQUATICUM (AUREOBACTERIUM)	0	0.000	8.87	GP-ROD CAT+
10)	MICROBACTERIUM IMPERIALE	0	0.000	9.19	GP-ROD CAT+
Other)					

8.2 Obrázky

Obrázek 1 Příznaky bakteriálního vadnutí rajčete, vlevo: unilaterální vadnutí listu, vpravo: nekróza stonku

<https://www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/cluster2.html>



Obrázek 2 Rostlina rajčete infikovaná *C. m. subsp. michiganensis*

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_images.htm



Obrázek 3 Sazenice rajčete dva týdny po inokulaci *C. m. subsp. michiganensis*

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_images.htm



Obrázek 4 Příznaky bakteriálního vadnutí rajčete na plodech rajčete

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_images.htm



Obrázek 5 Okrajové nekrozy lístků rajčete při infekci *C. m. subsp. michiganensis*

<http://www.extension.org/article/18337>



Obrázek 6 Skvrny typu “ptačí oko” na plodu rajčete infikovaném *C. m. subsp. michiganensis*

<http://www.extension.org/article/18337>



Obrázek 7 Fluidní bakteriální kolonie *C. m. subsp. michiganensis* na umělém kultivačním médiu

Foto: B. Kokošková



Obrázek 8 Nefluidní bakteriální kolonie *C. m. subsp. michiganensis* na umělém kultivačním médiu

Foto: B. Kokošková



Obrázek 9 Diskolorace cévních svazků na průřezu stonku rajčete při infekci *C. m. subsp. michiganensis*

Foto: J. Fousek

